

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION ANTIVIRALER
AKTIVITÄT AN EQUINEN PERIPHEREN
MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN UND
BOVINEN FETALEN NIERENZELLEN**

CARL HEINZ LEHNER

Disbui, München

1989

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und
Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München**

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

**UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION ANTIVIRALER AKTIVITÄT AN
EQUINEN PERIPHEREN MONONUKLEÄREN LEUKOZYTEN UND
BOVINEN FETALEN NIERENZELLEN**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München**

von

**Carl Heinz Lehner
aus Erding**

München 1989

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

INHALT

1. Einleitung	1
2. Aufbau	2
3. Zusammenfassung	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Literaturverzeichnis	6
7. Anhang	7
8. Zusammenfassung	8
9. Ergebnisse	9
10. Diskussion	10
11. Literaturverzeichnis	11
12. Anhang	12
13. Zusammenfassung	13
14. Ergebnisse	14
15. Diskussion	15
16. Literaturverzeichnis	16
17. Anhang	17
18. Zusammenfassung	18
19. Ergebnisse	19
20. Diskussion	20
21. Literaturverzeichnis	21
22. Anhang	22
23. Zusammenfassung	23
24. Ergebnisse	24
25. Diskussion	25
26. Literaturverzeichnis	26
27. Anhang	27
28. Zusammenfassung	28
29. Ergebnisse	29
30. Diskussion	30
31. Literaturverzeichnis	31
32. Anhang	32
33. Zusammenfassung	33
34. Ergebnisse	34
35. Diskussion	35
36. Literaturverzeichnis	36
37. Anhang	37
38. Zusammenfassung	38
39. Ergebnisse	39
40. Diskussion	40
41. Literaturverzeichnis	41
42. Anhang	42
43. Zusammenfassung	43
44. Ergebnisse	44
45. Diskussion	45
46. Literaturverzeichnis	46
47. Anhang	47
48. Zusammenfassung	48
49. Ergebnisse	49
50. Diskussion	50
51. Literaturverzeichnis	51
52. Anhang	52
53. Zusammenfassung	53
54. Ergebnisse	54
55. Diskussion	55
56. Literaturverzeichnis	56
57. Anhang	57
58. Zusammenfassung	58
59. Ergebnisse	59
60. Diskussion	60
61. Literaturverzeichnis	61
62. Anhang	62
63. Zusammenfassung	63
64. Ergebnisse	64
65. Diskussion	65
66. Literaturverzeichnis	66
67. Anhang	67
68. Zusammenfassung	68
69. Ergebnisse	69
70. Diskussion	70
71. Literaturverzeichnis	71
72. Anhang	72
73. Zusammenfassung	73
74. Ergebnisse	74
75. Diskussion	75
76. Literaturverzeichnis	76
77. Anhang	77
78. Zusammenfassung	78
79. Ergebnisse	79
80. Diskussion	80
81. Literaturverzeichnis	81
82. Anhang	82
83. Zusammenfassung	83
84. Ergebnisse	84
85. Diskussion	85
86. Literaturverzeichnis	86
87. Anhang	87
88. Zusammenfassung	88
89. Ergebnisse	89
90. Diskussion	90
91. Literaturverzeichnis	91
92. Anhang	92
93. Zusammenfassung	93
94. Ergebnisse	94
95. Diskussion	95
96. Literaturverzeichnis	96
97. Anhang	97
98. Zusammenfassung	98
99. Ergebnisse	99
100. Diskussion	100
101. Literaturverzeichnis	101
102. Anhang	102
103. Zusammenfassung	103
104. Ergebnisse	104
105. Diskussion	105
106. Literaturverzeichnis	106
107. Anhang	107
108. Zusammenfassung	108
109. Ergebnisse	109
110. Diskussion	110
111. Literaturverzeichnis	111
112. Anhang	112
113. Zusammenfassung	113
114. Ergebnisse	114
115. Diskussion	115
116. Literaturverzeichnis	116
117. Anhang	117
118. Zusammenfassung	118
119. Ergebnisse	119
120. Diskussion	120
121. Literaturverzeichnis	121
122. Anhang	122
123. Zusammenfassung	123
124. Ergebnisse	124
125. Diskussion	125
126. Literaturverzeichnis	126
127. Anhang	127
128. Zusammenfassung	128
129. Ergebnisse	129
130. Diskussion	130
131. Literaturverzeichnis	131
132. Anhang	132
133. Zusammenfassung	133
134. Ergebnisse	134
135. Diskussion	135
136. Literaturverzeichnis	136
137. Anhang	137
138. Zusammenfassung	138
139. Ergebnisse	139
140. Diskussion	140
141. Literaturverzeichnis	141
142. Anhang	142
143. Zusammenfassung	143
144. Ergebnisse	144
145. Diskussion	145
146. Literaturverzeichnis	146
147. Anhang	147
148. Zusammenfassung	148
149. Ergebnisse	149
150. Diskussion	150
151. Literaturverzeichnis	151
152. Anhang	152
153. Zusammenfassung	153
154. Ergebnisse	154
155. Diskussion	155
156. Literaturverzeichnis	156
157. Anhang	157
158. Zusammenfassung	158
159. Ergebnisse	159
160. Diskussion	160
161. Literaturverzeichnis	161
162. Anhang	162
163. Zusammenfassung	163
164. Ergebnisse	164
165. Diskussion	165
166. Literaturverzeichnis	166
167. Anhang	167
168. Zusammenfassung	168
169. Ergebnisse	169
170. Diskussion	170
171. Literaturverzeichnis	171
172. Anhang	172
173. Zusammenfassung	173
174. Ergebnisse	174
175. Diskussion	175
176. Literaturverzeichnis	176
177. Anhang	177
178. Zusammenfassung	178
179. Ergebnisse	179
180. Diskussion	180
181. Literaturverzeichnis	181
182. Anhang	182
183. Zusammenfassung	183
184. Ergebnisse	184
185. Diskussion	185
186. Literaturverzeichnis	186
187. Anhang	187
188. Zusammenfassung	188
189. Ergebnisse	189
190. Diskussion	190
191. Literaturverzeichnis	191
192. Anhang	192
193. Zusammenfassung	193
194. Ergebnisse	194
195. Diskussion	195
196. Literaturverzeichnis	196
197. Anhang	197
198. Zusammenfassung	198
199. Ergebnisse	199
200. Diskussion	200
201. Literaturverzeichnis	201
202. Anhang	202
203. Zusammenfassung	203
204. Ergebnisse	204
205. Diskussion	205
206. Literaturverzeichnis	206
207. Anhang	207
208. Zusammenfassung	208
209. Ergebnisse	209
210. Diskussion	210
211. Literaturverzeichnis	211
212. Anhang	212
213. Zusammenfassung	213
214. Ergebnisse	214
215. Diskussion	215
216. Literaturverzeichnis	216
217. Anhang	217
218. Zusammenfassung	218
219. Ergebnisse	219
220. Diskussion	220
221. Literaturverzeichnis	221
222. Anhang	222
223. Zusammenfassung	223
224. Ergebnisse	224
225. Diskussion	225
226. Literaturverzeichnis	226
227. Anhang	227
228. Zusammenfassung	228
229. Ergebnisse	229
230. Diskussion	230
231. Literaturverzeichnis	231
232. Anhang	232
233. Zusammenfassung	233
234. Ergebnisse	234
235. Diskussion	235
236. Literaturverzeichnis	236
237. Anhang	237
238. Zusammenfassung	238
239. Ergebnisse	239
240. Diskussion	240
241. Literaturverzeichnis	241
242. Anhang	242
243. Zusammenfassung	243
244. Ergebnisse	244
245. Diskussion	245
246. Literaturverzeichnis	246
247. Anhang	247
248. Zusammenfassung	248
249. Ergebnisse	249
250. Diskussion	250
251. Literaturverzeichnis	251
252. Anhang	252
253. Zusammenfassung	253
254. Ergebnisse	254
255. Diskussion	255
256. Literaturverzeichnis	256
257. Anhang	257
258. Zusammenfassung	258
259. Ergebnisse	259
260. Diskussion	260
261. Literaturverzeichnis	261
262. Anhang	262
263. Zusammenfassung	263
264. Ergebnisse	264
265. Diskussion	265
266. Literaturverzeichnis	266
267. Anhang	267
268. Zusammenfassung	268
269. Ergebnisse	269
270. Diskussion	270
271. Literaturverzeichnis	271
272. Anhang	272
273. Zusammenfassung	273
274. Ergebnisse	274
275. Diskussion	275
276. Literaturverzeichnis	276
277. Anhang	277
278. Zusammenfassung	278
279. Ergebnisse	279
280. Diskussion	280
281. Literaturverzeichnis	281
282. Anhang	282
283. Zusammenfassung	283
284. Ergebnisse	284
285. Diskussion	285
286. Literaturverzeichnis	286
287. Anhang	287
288. Zusammenfassung	288
289. Ergebnisse	289
290. Diskussion	290
291. Literaturverzeichnis	291
292. Anhang	292
293. Zusammenfassung	293
294. Ergebnisse	294
295. Diskussion	295
296. Literaturverzeichnis	296
297. Anhang	297
298. Zusammenfassung	298
299. Ergebnisse	299
300. Diskussion	300
301. Literaturverzeichnis	301
302. Anhang	302
303. Zusammenfassung	303
304. Ergebnisse	304
305. Diskussion	305
306. Literaturverzeichnis	306
307. Anhang	307
308. Zusammenfassung	308
309. Ergebnisse	309
310. Diskussion	310
311. Literaturverzeichnis	311
312. Anhang	312
313. Zusammenfassung	313
314. Ergebnisse	314
315. Diskussion	315
316. Literaturverzeichnis	316
317. Anhang	317
318. Zusammenfassung	318
319. Ergebnisse	319
320. Diskussion	320
321. Literaturverzeichnis	321
322. Anhang	322
323. Zusammenfassung	323
324. Ergebnisse	324
325. Diskussion	325
326. Literaturverzeichnis	326
327. Anhang	327
328. Zusammenfassung	328
329. Ergebnisse	329
330. Diskussion	330
331. Literaturverzeichnis	331
332. Anhang	332
333. Zusammenfassung	333
334. Ergebnisse	334
335. Diskussion	335
336. Literaturverzeichnis	336
337. Anhang	337
338. Zusammenfassung	338
339. Ergebnisse	339
340. Diskussion	340
341. Literaturverzeichnis	341
342. Anhang	342
343. Zusammenfassung	343
344. Ergebnisse	344
345. Diskussion	345
346. Literaturverzeichnis	346
347. Anhang	347
348. Zusammenfassung	348
349. Ergebnisse	349
350. Diskussion	350
351. Literaturverzeichnis	351
352. Anhang	352
353. Zusammenfassung	353
354. Ergebnisse	354
355. Diskussion	355
356. Literaturverzeichnis	356
357. Anhang	357
358. Zusammenfassung	358
359. Ergebnisse	359
360. Diskussion	360
361. Literaturverzeichnis	361
362. Anhang	362
363. Zusammenfassung	363
364. Ergebnisse	364
365. Diskussion	365
366. Literaturverzeichnis	366
367. Anhang	367
368. Zusammenfassung	368
369. Ergebnisse	369
370. Diskussion	370
371. Literaturverzeichnis	371
372. Anhang	372
373. Zusammenfassung	373
374. Ergebnisse	374
375. Diskussion	375
376. Literaturverzeichnis	376
377. Anhang	377
378. Zusammenfassung	378
379. Ergebnisse	379
380. Diskussion	380
381. Literaturverzeichnis	381
382. Anhang	382
383. Zusammenfassung	383
384. Ergebnisse	384
385. Diskussion	385
386. Literaturverzeichnis	386
387. Anhang	387
388. Zusammenfassung	388
389. Ergebnisse	389
390. Diskussion	390
391. Literaturverzeichnis	391
392. Anhang	392
393. Zusammenfassung	393
394. Ergebnisse	394
395. Diskussion	395
396. Literaturverzeichnis	396
397. Anhang	397
398. Zusammenfassung	398
399. Ergebnisse	399
400. Diskussion	400
401. Literaturverzeichnis	401
402. Anhang	402
403. Zusammenfassung	403
404. Ergebnisse	404
405. Diskussion	405
406. Literaturverzeichnis	406
407. Anhang	407
408. Zusammenfassung	408
409. Ergebnisse	409
410. Diskussion	410
411. Literaturverzeichnis	411
412. Anhang	412
413. Zusammenfassung	413
414. Ergebnisse	414
415. Diskussion	415
416. Literaturverzeichnis	416
417. Anhang	417
418. Zusammenfassung	418
419. Ergebnisse	419
420. Diskussion	420
421. Literaturverzeichnis	421
422. Anhang	422
423. Zusammenfassung	423
424. Ergebnisse	424
425. Diskussion	425
426. Literaturverzeichnis	426
427. Anhang	427
428. Zusammenfassung	428
429. Ergebnisse	429
430. Diskussion	430
431. Literaturverzeichnis	431
432. Anhang	432
433. Zusammenfassung	433
434. Ergebnisse	434
435. Diskussion	435
436. Literaturverzeichnis	436
437. Anhang	437
438. Zusammenfassung	438
439. Ergebnisse	439
440. Diskussion	440
441. Literaturverzeichnis	441
442. Anhang	442
443. Zusammenfassung	443
444. Ergebnisse	444
445. Diskussion	445
446. Literaturverzeichnis	446
447. Anhang	447
448. Zusammenfassung	448
449. Ergebnisse	449
450. Diskussion	450
451. Literaturverzeichnis	451
452. Anhang	452
453. Zusammenfassung	453
454. Ergebnisse	454

INHALT

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Interferon (IFN): Definition und Bedeutung	3
2.1.1 Definition und Interferon-Klassen	3
2.1.2 Funktion der Interferone in der körpereigenen Abwehr	7
2.2 Interferon-Induktion in vitro	11
2.2.1 Interferon-Induzenten	11
2.2.2 Bedingungen der in vitro-IFN-Induktion durch Viren	12
2.2.3 Virale Induktionsmechanismen	14
2.3 Stand der Forschung zur Erklärung der antiviralen Wirkung von Interferonen	15
2.3.1 Allgemeines	15
2.3.2 Zellbindung und Genaktivierung	15
2.3.3 Interferon-induzierte Enzymsysteme	16
2.3.4 Weitere Interferon-assoziierte Schutzmechanismen	17
2.4 Bedeutung von endogen gebildetem Interferon in der Infektionsabwehr	19
2.4.1 Interferon-Produktion unter physiologischen Bedingungen	19
2.4.2 Rolle von endogen gebildetem Interferon bei Virusinfektionen	20
2.4.3 Gezielte Induktion der endogenen Interferon-Produktion durch Paramunitätsinducer	21
2.5 Exogene IFN-Zufuhr zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten	23
2.6 Interferon zur Prophylaxe und Therapie in der Veterinärmedizin	25

	Seite
3. Eigene Untersuchungen	29
3.1 Material und Methoden	29
3.1.1 Zellkulturtechnik, Virusvermehrung, -anreicherung und -titrationsmethoden	29
3.1.1.1 Herstellung equiner mononukleärer Leukozytenkulturen	34
3.1.1.2 Herstellung primärer boviner fetaler Nierenzellkulturen	36
3.1.2 Behandlung von equinen PBML- und primären BEK-Kulturen zur Synthese extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirksamer Substanzen	37
3.1.2.1 Induktion equiner PBML-Kulturen	37
3.1.2.2 Induktion primärer BEK-Kulturen	37
3.1.2.3 Viren und Viruspräparate zur Zellkultur-Induktion	38
3.1.2.4 Gewinnung und Behandlung von Zellkulturüberständen	42
3.1.2.5 Kombinierte Prä-Induktion ("Priming") und Induktion equiner PBML-Kulturen	43
3.1.3 Nachweis der antiviralen Aktivität im Überstand induzierter Zellkulturen	46
3.1.3.1 Testprinzip	46
3.1.3.2 Grundlagen der Testauswertung	48
3.1.3.3 Standardisierung der Testwerte	49
3.1.3.4 Ermittlung der Sensitivitätsunterschiede der verwendeten Testzelllinien	50
3.1.4 Neutralisation antiviraler Aktivität	52
3.1.4.1 Testdurchführung	54
3.1.4.2 Testauswertung	56
3.1.5 Überprüfung des Einflusses der Behandlung von Zellkulturen mit antiviral wirksamen Überständen auf die Vermehrung von equinem Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) und bovinem Herpesvirus Typ 1 (BHV-1)	57
3.1.5.1 Messung der Herpesvirusvermehrung in homologen Zellkulturen, die mit antiviral wirksamen Zellkultur- überständen vorbehandelt wurden	57
3.1.5.2 Testauswertung	59

	Seite
3.2 Ergebnisse	60
3.2.1 Nachweis der antiviralen Aktivität im Überstand induzierter Zellkulturen	60
3.2.1.1 Kinetik antiviraler Aktivität gegen Stomatitis vesicularis Virus (VSV) im Überstand induzierter equ.PBML-Kulturen	61
3.2.1.2 Kinetik der im Überstand induzierter primärer BEK-Organzellkulturen nachweisbaren antiviralen Aktivität	72
3.2.1.3 Einfluß der Prä-Induktion ("Priming") von equ.PBML-Kulturen auf die Höhe der im Überstand nachweisbaren antiviralen Aktivität	81
3.2.2 Sensitivitätsunterschiede der Testzellen E.Derm. und WISH im Vergleich zu MDBK beim Nachweis VSV-antiviraler Aktivität in Überständen equ.PBML- und primärer BEK-Kulturen	86
3.2.3 Neutralisation antiviraler Aktivität in Überständen induzierter equ.PBML- und primärer BEK-Kulturen durch ein polyklonales Antiserum vom Schaf gegen humanes Leukozyten-Interferon (Anti-HuIFN)	89
3.2.4 Titerreduktion von equinem und bovinem Herpesvirus in homologen Zellkulturen nach Vorbehandlung mit antiviral wirksamen Zellkulturüberständen	102
3.2.4.1 Titerreduktion bei der EHV-1-Vermehrung in E.Derm.-Zellen	102
3.2.4.2 Titerreduktion bei der BHV-1-Vermehrung in MDBK-Zellen	108
3.2.4.2 Titerreduktion bei der BHV-1-Vermehrung in sekundären BEK-Kulturen	114
4. Besprechung der Ergebnisse	116
5. Zusammenfassung/	122
Summary	124
6. Literaturverzeichnis	126
7. Abkürzungen	139

1. Einleitung

Die Entdeckung eines, für die Unempfindlichkeit von aviären Chorioallantoiszellen gegenüber einer Infektion mit Influenzavirus verantwortlichen Faktors vor gut 30 Jahren durch Isaacs und Lindenmann (44), war die Basis der Erforschung einer Stoffgruppe, der mittlerweile über ihre antivirale Aktivität hinausgehend große Bedeutung im Regulationssystem der körpereigenen Abwehr zugesprochen wird (26,42,54,48). Die antivirale Wirksamkeit der Interferone - eine Eigenschaft die übrigens auch bei anderen Zytokinen, wie z.B. Tumor Nekrosis Faktor(TNF) $-\alpha$ und $-\beta$ (=Lymphotoxin), Interleukin-1 (IL-1) und B-cell-stimulating factor-2 (BSF-2), nachgewiesen wurde (11,83,96,125) - versprach therapeutische Alternativen zur antiviralen Chemotherapie (38).

Vor allem jedoch begründete die Tumorzell-antiproliferativen Effekte der Interferone das Interesse am therapeutischen Einsatz dieser Substanzen bei der Tumorbekämpfung (56). Auf diesem Gebiet waren, nachdem gentechnologisch hergestellte Interferone in ausreichender Menge zur Verfügung standen, Erfolge in der Behandlung von neoplastischen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems (z.B. bestimmte Leukämieformen) und einiger weniger anderer Tumorformen (z.B. Nierenzellkarzinome, maligne Melanome, Kaposi Sarkom) mit rekombinantem humanen Interferon- α (rHuIFN- α) erzielt worden. Bei den bedeutendsten Tumorerkrankungen (z.B. Lungenkarzinom, Colon-/Rektumkarzinom, etc.) gelang damit allerdings kein Therapiedurchbruch (56).

Durch die Verfügbarkeit relativ preiswerter, rekombinanter humaner Interferone stieg auch das Interesse der Veterinärmedizin an der Interferonanwendung, wobei dem Einsatz in der Bekämpfung viraler Infektions- und multikausaler Infektionskrankheiten besonderer Stellenwert zukommt (9). Hierzu muß die antivirale Aktivität der heterologen humanen und der jeweils homologen Interferone bei den Nutztierarten gegen relevante Virusinfektionskrankheiten abgeklärt werden.



Dabei gilt es zu untersuchen, wie die exogene Interferon-Zufuhr (IFN-Therapie) im Gegensatz zur gezielten endogen-induzierten IFN-Synthese (IFN-Induktion) zu bewerten ist, und welche Indikationen für die eine oder andere Methode angezeigt sind.

Nachdem eine Interferon-Induktion zu den Wirksamkeitskriterien vieler sogenannter Paramunitätsinducer oder Immunmodulatoren gehört, sind Ablauf, Qualität und Quantität einer endogenen Produktion antiviral wirksamer Substanzen nach gezielter Induktion bei den Heim- und Nutztierarten von besonderem Interesse.

Anliegen der vorliegenden Arbeit ist die in vitro Induktion antiviral wirksamer Substanzen in praxisnahen Zellkulturmodellen von Pferd und Rind mit Virusarten bzw. Viruspräparaten, die in vivo bereits als Paramunitätsinducer eingesetzt werden oder zur Anwendung kommen könnten.

Die antivirale Wirksamkeit sollte mit einer einfachen "Screening"-Methode geprüft werden, mit den zusätzlichen Zielen, Sensitivitätsunterschiede bei Zellkulturen zu klären und die Abgrenzung von Interferonwirkungen mit einem spezifischen Antiserum im homologen und heterologen System zu versuchen. Festgestellte antivirale Aktivitäten sollten standardisiert und auf ihren Einfluß bei der Vermehrung von equinen und bovinen Herpesviren geprüft werden.

2. Schrifttum

2.1. INTERFERON (IFN): DEFINITION UND BEDEUTUNG

2.1.1. Definition und Interferon-Klassen

Interferone (IFN) bilden eine Gruppe von Proteinen, die virusunspezifische antivirale Aktivität zumindest in allogenen Zellen über zelluläre Stoffwechselprozesse, an denen mRNA- und Proteinsynthese beteiligt sind, vermitteln (88). Der Nachweis der antiviralen Wirksamkeit von Interferonen in vitro kann mit den in der Tabelle 1 aufgelisteten Testmethoden geführt werden (35).

Antigenetisch und funktionell lassen sich 3 IFN-Hauptklassen unterscheiden, die bei allen Säugetierspezies nachgewiesen wurden (91).

IFN- α :

Mit diesem Begriff wird eine Gruppe strukturell verwandter Polypeptide bezeichnet.

Beim Menschen lassen sich genetisch mindestens 14 Subtypen unterscheiden, deren Nukleotidsequenzen untereinander eine 80 bis 95 %-ige Homologie aufweisen (48,54).

Als quantitativ bedeutendste Produzentenzellen gelten periphere Leukozyten, die durch Virusinfektion bzw. durch doppelsträngige RNA (dsRNA) zur IFN-Synthese stimuliert wurden. Grundsätzlich kann jedoch jede Zellart zur IFN- α (und - β)-Produktion aktiviert werden (48,85). Auch nach Kontakt mit Tumorzellen können z.B. LGL-Zellen (large granular lymphocytes) IFN- α produzieren (122).

Nach der IFN-Gen-Aktivierung werden mehrere IFN- α -Subtypen gleicher biologischer Wirksamkeit, aber unterschiedlicher Potenz (14), simultan exprimiert, wobei die Anteile der einzelnen Subtypen abhängig sind vom induzierenden Agens, der Zellart und des Differenzierungsgrades der induzierten Zelle (53,102).

Tabelle 1 : Möglichkeiten zur Überprüfung einer antiviralen Wirksamkeit von Interferonen (nach Grossberg et al., 1984) (35)

Testprinzip:

1. Reduktion des zytopathogenen Effektes (cpE) nach Virusbelastung (VSV⁺, EMCV⁺⁺)
2. Plaque Reduktion im semisoliden Medium
3. Reduktion des Virusertrages bzw. viraler Enzyme, Proteine oder viraler RNA:
 - infektiöses Virus
 - virales Hämagglutinin (Influenza Virus, Sindbis Virus, Encephalomyokarditis-Virus, Arbovirus)
 - Hemmung der reversen Transkriptase (Retroviren)
 - Neuraminidase (rekombinantes Influenza Virus)
 - Hemmung der viralen RNA-Synthese

4. andere Tests:

- Hemmung der Haemabsorption
- Immunofluorometrische Zellzählung (VSV)
- Hemmung der DNA-Synthese

Meßprinzip :

optische Bestimmung des Endpunktes bei dem der cpE um 50 % reduziert ist;

Zählung der Virusplaques ;

Virustiterbestimmung (50 %-cpE-Endpunkt oder Plaquebildung);
Hämagglutinations-Test ;

³H-Thymidin-Methyltriphosphat-Einbau;

Neuraminidase-Nachweis;

³H-Uridin-Einbau;

Photometrische Hb-Messung oder optische Auszählung haemabsorbierender Zellen

Nachweis markierter virusspezifischer Antigene

³H-Thymidin-Einbau

(⁺ VSV = Stomatitis vesicularis Virus

⁺⁺ EMCV = Encephalomyokarditis-Virus)

Die antivirale Aktivität der meisten IFN- α -Subtypen ist säurestabil (pH 2). Abhängig vom Virusinduzenten und bei Autoimmunerkrankungen (z.B. Lupus erythematodes) konnten auch pH 2-labile IFN- α -Subtypen nachgewiesen werden (16,54,85,91,94,106).

Unter den Subtypen des bovinen IFN- α sind ebenfalls einige pH 2-labil (9), und auch das nach Induktion equiner Leukozyten mit Newcastle Disease Virus (NDV) produzierte IFN soll keine Säurestabilität zeigen (128).

IFN- β :

Humane β -Interferone sind Glykoproteine (91).

Sie sind Produkte einer Genfamilie, die beim Menschen wahrscheinlich aus 2 (48), beim Rind und Pferd aus offensichtlich 5 Genen besteht (23). Die Nukleinsäuresequenzen humaner IFN- β -Gene zeigen eine 30 %-ige Homologie zu den Sequenzen humaner IFN- α -Gene (48).

An der Produktion der β -Interferone sind die selben Zellpopulationen beteiligt, wie zur Produktion von IFN- α . Induzierte Zellen produzieren meist Proteine beider IFN-Klassen gemeinsam in unterschiedlichen Anteilen (122).

Die antivirale Aktivität der β -Interferone ist pH 2-stabil (48,54).

IFN- γ :

IFN- γ hat die Struktur eines Glykoproteins.

Nur ein Gen kodiert für IFN- γ ; nur sehr geringe Homologien bestehen zu den Nukleinsäuresequenzen der α - und β -Interferone. Strukturelle Übereinstimmungen wurden dagegen zum Interleukin-2-Gen festgestellt (53).

Die IFN- γ -Produktion ist eine spezielle Funktion von mitogen-stimulierten, nicht sensibilisierten, bzw. von spezifisch antigen-stimulierten, sensibilisierten T-Lymphozyten (48,54).

Die pH 2-labile antivirale Aktivität von IFN- γ tritt in ihrer Bedeutung hinter den vielfältigen, immunregulatorischen Funktionen dieses Proteins zurück (86).

Die Tabellen 2 a bis c geben einen Überblick über verschiedene IFN-Klassen und ihre Haupteigenschaften bei Mensch, Rind und Pferd :

Tabelle 2 a: Charakteristika humaner Interferone (nach Joklik, 1984)
(48)

IFN-Klassen			
	α	β	γ
Struktur	Polypeptid	Glykoprotein	
Genorganisation	keine Introns	enthält Introns	
Anzahl der Gene	mind. 14	2	1
Anzahl der Aminosäuren	143	145	146
pH 2-Stabilität	+ ($\pm$)	+	-

Tabelle 2 b: Charakteristika boviner Interferone (nach Bielefeldt Ohmann et al., 1987, und DeMaeyer et al., 1988)
(9,23)

IFN-Klassen			
	α	β	γ
Struktur	Glykoprotein		Protein
Genorganisation	keine Introns		enthält Introns
Subfamilien	Klasse 1	10 - 12 Subtypen	5 Subtypen
	Klasse 2	15 - 20 Subtypen	1 Typ
Anzahl der Aminosäuren	165 - 172	166	145
pH 2-Stabilität	+ ($\pm$)	+	-

Tabelle 2 c : Charakteristika von equinem IFN- α und - β (nach Himmler et al., 1986 und DeMaeyer et al., 1988) (23,39)

IFN-Klassen			
		α	β
Genorganisation		keine Introns	
Subfamilien	Klasse 1	7 Subtypen	5 Subtypen
	Klasse 2	8 Subtypen	
Anzahl der Aminosäuren		161	166
pH 2-Stabilität		+	+

Grundlage zur IFN-Produktion im Labor ist die Stimulation von Effektorzellen mit einer interferonogenen Substanz (54,106,64).

Exprimierte Interferone können in den Extrazellularraum sezerniert werden und binden an spezifische Rezeptoren (ein gemeinsamer Rezeptor für IFN- α und - β , ein spezifischer Rezeptor für IFN- γ) auf benachbarten Zellen (91).

2.1.2. Funktionen der Interferone in der körpereigenen Abwehr

Interferone nehmen durch ihre Beteiligung an einer Vielzahl von biologischen Funktionen eine wichtige Stellung im körpereigenen Abwehrsystem ein (42,48,91).

Tabelle 3 enthält eine Zusammenstellung der wichtigsten IFN-Aktivitäten.

Tabelle 3 : Biologische Funktionen der Interferone

IFN-Klasse	Effekt	Bedeutung	Literatur- hinweise
antivirale Aktivität:			
$\alpha, \beta, (\gamma)$	Induktion der Synthese antiviral wirksamer Enzyme ; Stabilisierung der Plasmamembran und subzellulärer Strukturen;	-Degradation viraler mRNA. -Translationshemmung viraler Proteine . - Behinderung von Virusad- sorption, -penetration, -"un- coating", und "budding" .	(48) (48,93)
α, β	MHC-I-Ag-Expression	}-Verstärkung der Ag ⁺ -Bin- dung, Phagozytose .	(59,85,103)
γ	MHC-I/MHC-II-Ag- Expression		
α, β, γ	Verstärkung der Fc-Receptor-Expression		
antiproliferative Aktivität:			
α, β, γ	Lymphozyten	Verminderung von -Ak ⁺⁺ -bildenden Zellen, -Memory-Zellen, -mitogen-stimulierter T-Zell-Proliferation .	(20) (54)
α, β, γ	Tumorzellen	Erhöhung von -Zellgenerationszeit, -Tumor-Ag-Expression, -Tumorzell-Abwehr-	(51,54) (54)
		Aktivierung von -T-Zellen, -NK-Zellen, -Makrophagen	(54)
weitere immunregulatorische Aktivitäten:			
α, β, γ	Erhöhung der Ag-spezifischen T-Zell-Zytotoxizität		(54)
γ	Unterstützung der T-Helfer-Zell-Funktion		(85)
γ	NK-Zell-Aktivierung:	-Erhöhung der spontanen zellvermittelten Zyto- toxizität	(20,48,85)
γ	Makrophagenaktivierung:	Erhöhung von -Phagozytose, -IL-2-Rezeptor-Expression,	(54,130) (103,130)
β	-"-	-IgM-Rezeptor-Expression,	(103)
α, β	-"-	-IL-1-Sekretion	(103)

(⁺ Ag = Antigen; ⁺⁺ Ak = Antikörper)

Darüberhinaus stellt IFN- α durch die Wirkung auf Opioidrezeptoren möglicherweise ein wesentliches Bindeglied zwischen Immunsystem und neurosekretorischem System dar (106).

IFN- γ hat durch die Makrophagen-aktivierenden Eigenschaften Anteil an der Abwehr chlamydialer, bakterieller (mit IFN- β), sowie parasitärer Infektionen (30,86,101,114,130), und wirkt bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungen mit (10).

Die möglichen Rollen von IFN- α und IFN- γ im Ablauf einer normalen Immunreaktion zeigt Abbildung 1 (106) :

Vorausgesetzt ist , daß jedes Antigen zugleich auch ein Interferonogen sei (106).

Erklärung zu Abb. 1 (S. 10)

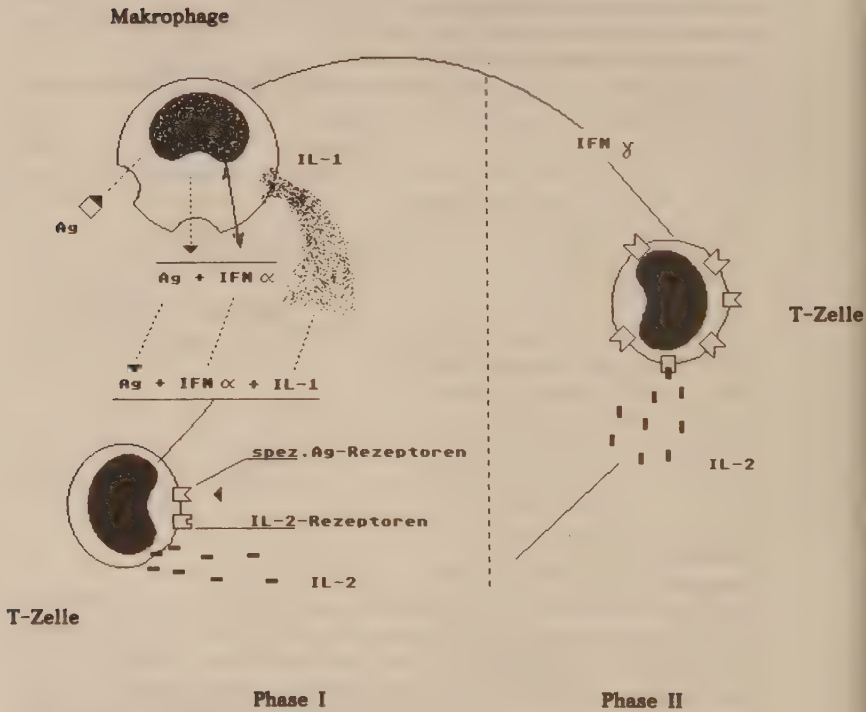
Phase I :

Nach der Aufnahme und Verarbeitung des Antigens (Ag) im Mononukleären-Phagozyten-System (MPS) wird IFN- α synthetisiert. IFN- α stimuliert die IL-1-Sekretion im MPS. IL-1 und IFN- α beteiligen sich an der Ag-Präsentation auf der T-Zell-Oberfläche. Nach der T-Zell-Aktivierung werden verstärkt IL-2-Rezeptoren und spezifische Ag-Rezeptoren exprimiert, die IL-2-Sekretion steigt und die T-Zellen proliferieren.

Phase II :

IL-2 stimuliert die IFN- γ -Produktion in T-Zellen. IFN- γ entfaltet seine immunregulatorischen Wirkungen. Es baut sich eine positive Rückkopplung zum MPS auf, was zur weiteren IL-1-Produktion und somit zur Aufrechterhaltung der Immunantwort führt.

Abb. 1 : mögliche Rollen von IFN- α und - γ bei einer normalen Immunreaktion (Erklärung auf S. 9)



2.2. INTERFERON-INDUKTION IN VITRO

2.2.1. Interferon-Induzenten (nach Ho, 1984) (41)

IFN-Induzenten lassen sich nach der Art der durch sie induzierten IFN-Produktion differenzieren.

Typ-1-Produktion:

Sie repräsentiert die klassische Induktionsart nach Interaktion zwischen Induzent und Zelle. Man unterscheidet hierbei potente biologische Induzenten (z.B. RNA-, DNA-Viren, Pflanzenviren, dsRNA von normalen Zellen) und relativ schwache, meist komplex aufgebaute Induzenten (z.B. Bakterien, Rickettsien, Mykoplasmen, Protozoa, Tumorzellen), aber auch LPS, Pilzprodukte u.v.a.m., sowie synthetische oder chemische Produkte (hochmolekulare Polymere und niedermolekulare Substanzen) (81).

Typ-2-Produktion:

Sie führt über die Aktivierung von Lymphozyten zur IFN- γ -Synthese. In diese Induzenten-Gruppe fallen T-Zell-Mitogene (z.B. ConA, PHA) (97), aber auch Substanzen, die bereits oben aufgeführt wurden (z.B. DNA-Viren, LPS) (108).

Typ-3-Produktion:

Die Produktion von IFN- γ und pH 2-labilen IFN- α -Subtypen durch Subpopulationen humaner mononukleärer Zellen ohne Anwesenheit eines exogenen Induzenten wurde nachgewiesen (28). Ebenso wurde die Präsenz von IFN- α -mRNA in humanen Leukozyten aus Milz, Niere und Leber ohne vorherige exogene Induktion festgestellt (118).

Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche endogene Interferon-Produktion im Rahmen der physiologischen Regulationsfunktionen hin (12).

2.2.2. Bedingungen der in vitro IFN-Induktion durch Viren

Folgende Faktoren, den Virusinduzenten und die Produzentenzelle betreffend, können Einfluß auf die IFN-Induktion in vitro ausüben (nach Ho, 1984) (41):

Virusinduzent:	Virusspezies, -Subtyp, Stamm, Wildtyp, attenuiert (40,90) Verhältnis intaktes und defektes Viruspartikel, Virustiter, Kontaminationen (z.B. IFN).
Zellkultur :	Zellspezies, Gewebeart, Passagenzahl, Alter der Kultur, Kontaminationen (z.B. Mykoplasmen), Kultur aus einheitlichen oder gemischten Zellarten.

Infektiöses Virusmaterial kann durch zytopathogene Effekte bzw. Depression der Protein-Synthese die IFN-Produktion abschwächen. Virus-Teilinaktivierung kann einen steigernden Effekt auf die IFN-Induktion haben (z.B. bei Influenza Virus, NDV, Semlicki Forest Virus, Bluetongue Virus) (41).

Die Anwesenheit von IFN oder Virusinduzenten in geringen Mengen vor der eigentlichen Induktion hat einen positiven Einfluß auf die IFN-Produktion, der mit dem Begriff "Priming" beschrieben wurde (54,64,110). Die IFN-Synthese setzt auch früher ein, als in nicht vorstimulierten Zellen (48,99,110).

Nach erfolgter Induktion können sich die IFN-produzierenden Zellen für bestimmte Zeit refraktär gegenüber einer erneuten Induktion verhalten ("Hyporesponsiveness") (48,54). Hierbei scheinen aber, je nach Versuchsbedingungen, erhebliche Unterschiede zu bestehen. Murine Makrophagen wurden z.B., nachdem sie mit hohen Dosen IFN (bis 10.000 U./ml) vorbehandelt worden waren, unempfindlich gegenüber NDV-Induktion ("Blocking"), während die IFN-Induktion durch Poly rI:rC/DEAE-Dextran nicht beeinflusst war (32).

Tabelle 4 enthält eine Übersicht der in vitro IFN-Induktion durch Säugerviren in bovinen, caninen, equinen und porcinen Zellkulturen:

Tabelle 4 : IFN-Induktion durch Viren in bovinen, caninen, equinen und porcinen Zellkulturen

Tierart	Virusinduzent	Zellart	nachgewiesene IFN-Klasse	Literaturhinweise
Rind	NDV	Niere	β	(56a)
		fetale Niere	β ($+\alpha$)	(54,58)
		Leukozyten	α	(17)
	Sendai Virus	Leukozyten	$\alpha+\beta$	(46,106)
	Parainfluenza 3	fetale Niere	β	(100)
	BHV-1	T-Zellen	γ	(108)
	BHV-2	PBML ⁺	γ (?)	(65)
	MKS	Niere	β	(2)
	Bluetongue Virus	Niere	β	(2)
Hund	NDV	lymphoide Zellen	n.k. ⁺⁺	(119,120)
		- Milz		
		- Blut		
		- Knochenmark		
		- Thymus		
		- Lymphknoten		
	CHV	dto.	n.k.	(119)
Pferd	NDV	Leukozyten	n.k.	(17)
		PBML	α	(128,129)
		Haut	β	(128)
Schwein	NDV	Leukozyten	$\alpha+\beta$	(17,115)
	Influenza A	Leukozyten	α	(58)

(⁺ PBML = peripheral blood mononuclear leucocytes;

⁺⁺ n.k. = nicht klassifiziert)

2.2.3. Virale Induktionsmechanismen

Obwohl die molekularen Vorgänge bei der IFN-Induktion noch nicht vollständig geklärt sind (48), lassen sich, insbesondere für virale Induzenten, folgende Aussagen zum induktiven Prinzip und zu induzierten zellulären Stoffwechselvorgängen machen:

Ohne Anwesenheit eines endogenen oder exogenen Induzenten wird die IFN-Synthese i.d.R. nicht initiiert (49,106).

Das Schlüssel-molekül der viralen Induktion ist die doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA = double stranded ribonucleic acid), die natürlicherweise in dsRNA-Viren oder als replikative Form viraler einsträngiger (ss = single stranded) RNA vorkommt (48,33). Bei nicht replikationsfähigen Paramyxoviren und Myxoviren wird - ssRNA und + ssRNA im Laufe der Virusbeseitigung freigesetzt. Es können sich komplementäre Stränge zu dsRNA verbinden und zur Induktion führen (48).

Der genaue Zusammenhang zwischen viraler dsRNA und dem Beginn der IFN-mRNA-Transkription ist nicht bekannt. Labile Repressoren der IFN-Gene wurden postuliert (116).

Bereits kurze Exposition der Zellen mit dem Induzenten (z.B. 1 Stunde) reicht zur Inangangssetzung der IFN-Synthese aus (33). Die IFN-Produktion wird nur über eine begrenzte Zeitdauer (abhängig vom Induzenten und der Zellart) aufrechterhalten (64). Dies läßt die Existenz eines limitierenden Regulationsmechanismus vermuten (116).

Weiterhin scheint die IFN-Synthese, abhängig von der Art des Induzenten, durch unterschiedliche Gene kontrolliert zu werden, wobei auch die Virulenz bzw. Avirulenz der Virusinduzenten für das Zellsystem diese Kontrolle beeinflußt (54).

Während die IFN- β -Induktion mit Sendai Virus auf humanen Fibroblasten durch virale dsRNA vermittelt wird, sind bei der IFN- α -Induktion mit dem gleichen Virus auf humanen Lymphozyten auch $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase abhängige Membranvorgänge beteiligt (62).

Die interferonogene Wirkung viraler Strukturproteine auf Milzzellen konnte für Sendai-Virus-Glykoproteine und Adenovirus-Fiberproteine nachgewiesen werden (48).

2.3. STAND DER FORSCHUNG ZUR ERKLÄRUNG DER ANTIVIRALEN WIRKUNG VON INTERFERONEN

2.3.1. Allgemeines

Die antivirale Wirkung der Interferone beruht auf Effekten, die zu einer Veränderung des zellulären Stoffwechsels führen, so daß eine Virusreplikation nicht mehr stattfinden kann (54).

Voraussetzungen dazu bilden die Bindung der extrazellulären Interferone an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche, die Internalisation und die Fähigkeit der Zelle zur mRNA- und Proteinsynthese (48,91,107). Der zeitlich auf wenige Tage begrenzte Schutz der Zelle vor viraler Zytopathogenität ist in erster Linie abhängig von der IFN-Qualität und der Menge infektiöser Partikel pro Zelle (48).

2.3.2. Zellbindung und Genaktivierung

Die spezifische Bindung von IFN- α und - β an Zelloberflächen erfolgt an einem gemeinsamen Rezeptor, um den beide Liganden kompetitieren (24,91,107).

Natürliche Zellen (z.B. PBML) besitzen meist weniger IFN-Rezeptoren als Zelllinien.

Eine heterospezifische antivirale Aktivität wird durch Rezeptoren ermöglicht, die heterologes IFN spezifisch binden können (91).

IFN- γ bindet an eine genetisch und biochemisch vom IFN- α /- β -Rezeptor unterscheidbare Bindungsstelle (91,107).

Eine Zellaktivierung erfolgt erst nach der Internalisation der Interferone durch rezeptorvermittelte Endozytose. Mikroinjektion von murinem IFN- β in L929-Zellen zeigte z.B. keine aktivierende Wirkung (57).

Internalisiertes IFN wird in ca. 3 Minuten zum Zellkern transloziert. Auf der Kernmembran von L929-Zellen wurden Rezeptoren für IFN- β und - γ gefunden (57).

Ob und welche "second messenger" letztlich für die Genaktivierung verantwortlich sind, ist noch unklar. Ferner ist noch nicht sicher, ob eine Interaktion mit Gensequenzen, die für jede IFN-Klasse spezifisch responsiv sind, stattfindet (85).

2.3.3. Interferon-induzierte Enzysysteme

In IFN-induzierten Zellen werden Enzyme aktiviert, die in nicht induzierten Zellen nicht in Erscheinung treten.

Durch diese Enzyme wird letztendlich die Translatierbarkeit viraler mRNA und die Synthese virusspezifischer Proteine gehemmt, was zumindest für Picorna-, Toga-, Rhabdo-, Myxo-, Paramyxo-, Herpes- und Papovaviren nachgewiesen wurde (48).

Sie werden im 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase-Nuklease-System und im P1/eIF-2 α -Protein-Kinase-Phosphoprotein-Phosphatase-System zusammengefaßt (91).

2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase-Nuklease-System (2'-5' (A)_n-S)

2'-5' (A)_n-S katalysiert, nach Aktivierung durch natürliche oder synthetische dsRNA, die Synthese von 2'-5'-Oligoadenylaten (2'-5'(A)_n) aus ATP. Diese aktivieren eine, in der nicht induzierten Zelle latent vorhandene, Endoribonuklease (RNase L), deren Substrat aus einsträngiger RNA (ssRNA) besteht (z.B. mRNA, tRNA) (91).

Die 2'-5'-Phosphodiesterase katalysiert die Rückführung von 2'-5'(A)_n in ATP und AMP und ist an der Degradation von tRNA beteiligt (24,91).

Prinzipiell alle Interferone können die 2'-5'(A)_n-S-Produktion induzieren. Von ihr werden mehrere Isoenzyme in unterschiedlicher Lokalisation und mit unterschiedlicher dsRNA-Sensibilität gebildet (63).

Während dieses Enzymsystem in vitro nicht zwischen viraler und zell-eigener RNA unterscheidet, führt es in vivo zur selektiven Degradation viraler ssRNA. Ein Zusammenhang mit der lokalisierten Aktivierung unterschiedlich RNA-sensitiver 2'-5' (A)_n-S erscheint möglich (63).

P1/eIF-2 α -Protein-Kinase-Phosphoprotein-Phosphatase-System

Dieses System katalysiert dsRNA-abhängig die Phosphorylierung des ribosomenassoziierten Proteins P1 und der α -Untereinheit des Protein-Synthese-Initiierungsfaktors eIF-2.

Diese Inaktivierung inhibiert durch Hemmung der mRNA-Translation die Proteinsynthese auf ribosomaler Ebene.

P1/eIF-2 α -Phosphoprotein-Phosphatase dephosphoryliert P1 und eIF-2 α dsRNA-unabhängig (91).

Jedes der beschriebenen Enzymsysteme für sich ist in der Lage die Proteinsynthese in vitro zu hemmen (91). Das 2'-5' (A)_n-S-System ist auch in die antiproliferativen und differenzierungsfördernden IFN-Wirkungen involviert (52,91).

Die unterschiedliche Potenz der antiviralen Aktivität verschiedener IFN-Klassen und -Subtypen hängt offenbar mit der Fähigkeit der Interferone zusammen, beide, eines der beiden oder keines dieser Enzymsysteme zu aktivieren (91).

2.3.4. Weitere IFN-assoziierte zelluläre Schutzmechanismen

Die in 2.3.3. beschriebenen Enzymsysteme werden nicht bei jeder Virusinfektion, bei deren Ablauf Zellen durch Interferon geschützt werden, aktiviert bzw. ihre Aktivierung ist nur ein Teil der induzierten IFN-Wirkungen (48,91). Es gibt Hinweise dafür, daß , abhängig von der jeweiligen Zellart, jeder Virusinfektion mit einem unterschiedlichen Spektrum an antiviralen Mechanismen begegnet wird (7).

Beispiele weiteren IFN-induzierter, viroprotektiver Effekte zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5 : Beispiele weiterer IFN-induzierter, antiviraler Mechanismen

Induzierte Zellfunktion	Wirkung	Literaturhinweise
Erhöhung der -MHC-I/II-Ag-Expression, -Virus-Ag-Expression, -Fc-Rezeptor-Expression	antizelluläre Aktivität des Immunsystems gegen virus- infizierte Zellen (Makrophagen-, NK-Zell-Akti- vierung, Erhöhung der T-Zell- Zytotoxizität und der Antikörper- abhängigen zellulären Zytotoxizität) (91)	
-Aktivität der Ca^{2+} -ab- hängigen cAMP	Plasmamembranstabilisierung durch Erhöhung des Anteils ungesättigter Fettsäuren	(64)
Inhibition der - CAP-Methylierung der viralen m-RNA	keine Assoziation viraler mRNA's an Ribosomen	(91)

2.4. BEDEUTUNG VON ENDOGEN GEBILDETEM INTERFERON IN DER INFektionsABWEHR

2.4.1. Interferonproduktion unter physiologischen Bedingungen

Hochspezifische Nachweismethoden (z.B. RNA-"blot"-hybridisierung , ermöglichten die Entdeckung von IFN-mRNA's in Organen normaler Individuen (12,118).

Selektiv lokalisierte 2'-5' (A)_n-S und P1/eIF-2 α -Protein-Kinase konnten in vivo bei Mensch und Maus festgestellt werden, teilweise ohne gleichzeitigen Nachweis von Interferonen (12).

Die Tatsache, daß eine Transkription spezifischer IFN-Gene ohne offensichtliche exogene Induktion stattfindet, bildet, zusammen mit den Kenntnissen über die pleiotropen biologischen IFN-Funktionen, die Argumentationsbasis für die Existenz einer physiologischen, im Rahmen der Erhaltung der Homöostase notwendigen Interferonproduktion (91,118).

Die physiologische IFN-Produktion wird als lokalisierte Reaktion des lymphoiden Gewebes an bestimmten, "strategisch" wichtigen Stellen im Organismus auf endogene und exogene Stimuli verstanden (12).

Nach Virusinfektion erhöht sich nicht nur die Menge des produzierten IFN , es werden auch andere IFN-Gene als im physiologischen Zustand aktiviert. So wurden in normalen humanen Gewebezellen nur IFN- α_1 - und - α_2 -Transkripte nachgewiesen, in virusinfizierten, peripheren Blutleukozyten aber hauptsächlich IFN- α_1 - und IFN- β_1 -Transkripte (118).

Die im Rahmen der physiologischen Produktion entstehenden, geringen IFN-Mengen könnten für den selektiv lokalisierten Aufbau von Basisreservoirs weniger lymphoider Zellen in "erhöhter Alarmbereitschaft" (d.h.: Zellen im "Priming"-Stadium, mit erhöhter MHC-I/II-Ag-Expression oder erhöhter NK-Aktivität, etc.) ausreichen (12).

2.4.2. Rolle von endogen gebildetem Interferon bei Virusinfektionen

Die Behandlung von empfänglichen Mäusen mit Anti-IFN-Serum führte zu schwereren Verlaufsformen bei Semlicki Forest Virus-, EMCV-, Herpesvirus-, VSV-Infektionen und Infektionen mit onkogenen Viren (34).

Wurden resistente Mäusestämme mit Anti-IFN-Serum behandelt, so erkrankten sie nach Infektionen mit murinem Herpesvirus-3, Influenzavirus, Arbovirus Gruppe A, EMCV, murinem Cytomegalievirus und Herpes simplex Virus (HSV)-1 (6a,53,34).

IFN-Bildung und Unempfindlichkeit gegen viele Virusinfektionen korrelieren positiv (53).

Milz-Makrophagen in vivo HSV-1-infizierter, HSV-1-resistenter Mäuse begannen nach längerer Kultivierung (bis 10 Tage) mit der Produktion infektiöser HSV-1-Partikel (25). Die IFN-induzierte Hemmung der HSV-1-Replikation führte also nicht zur Viruseliminierung, sondern nur zum Schutz vor zytopathogenen Effekten. Eine Persistenz der Infektion wurde nicht verhindert (48,25).

Rekombinantes murines IFN- β (rMuIFN- β) konnte zwar die HSV-1-Replikation in vivo im akuten Infektionsstadium hemmen, aber die Etablierung einer latenten Infektion nicht verhindern (127).

In bovinen Zellen entwickelten nicht-zytopathogene BVD-Stämme, trotz IFN-Induktion, persistierende Infektionen. Durch zytopathogene BVD-Stämme induziertes IFN dagegen konnte bovine Zellen vor einem BVD-verursachten zytopathogenen Effekt schützen (8).

Ein Zusammenhang zwischen BHV-1-Replikation in der Nasenschleimhaut und IFN-Sekretion wurde festgestellt (9). Ferner konnte lokal, durch nasale BHV-1-Applikation induziertes IFN -wenigstens partiell- Schutz vor nachfolgender BHV-1- oder anderen Virusinfektionen vermitteln (9). Intranasal applizierte Parainfluenza-3-Lebendimpfstoffe, sowie ein avirulentes IBR/IPV-Virus führten jeweils zu einer IFN- α -Produktion, die parallel zur Virusvermehrung verlief (3a).

Orale Infektion von Kälbern mit bovinem Rotavirus hatte erhöhte IFN-Titer in Darmschleimhaut, Darminhalt und Serum zur Folge. Hohe Virusdosen verursachten eine früher einsetzende IFN-Produktion und lösten keine Krankheitssymptome aus, nach niedrigen Virusdosen kam es zu einer verzögerten IFN-Produktion und zu klinischen Symptomen (Diarrhoe) (9).

Endogen gebildetes IFN nach Virusinfektionen scheint somit Bedeutung als erste lokale Abwehrbarriere zu besitzen, mit dem Ziel die Virusreplikation so lange einzudämmen, bis andere Abwehrmechanismen zur Eliminierung der infektiösen Partikel bzw. bereits infizierter Zellen bereit stehen (32).

2.4.3. Gezielte Induktion der endogenen IFN-Produktion durch Paramunitätsinducer

Paramunitätsinducer ("biological response modifiers", Immunmodulatoren) werden zur iatrogenen Erzeugung einer Paramunität, d.h. des erworbenen, kurzzeitigen, nicht-erreger- und nicht-antigespezifischen Schutzzustandes gegen Noxen, eingesetzt (73,74,76,98,117).

Funktionelle Grundlagen der Beeinflussung unspezifischer Abwehrleistungen sind, unter anderem, die Induktion der Bildung von körpereigenem Interferon, die Steigerung der Mikro- und Makrophagentätigkeit, allgemein eine verstärkte Mediatoren-/Lymphokinfreisetzung und die Aktivierung der spontanen, zellvermittelten Zytotoxizität (73).

Der Vorteil der Induktion körpereigener Interferone liegt in der Vermeidung der Applikation unphysiologischer, eventuell toxischer und in Pharmakokinetik und Metabolismus meist unzureichend erforschter IFN-Dosen (wie das z.B. bei exogener IFN-Zufuhr der Fall ist) (12,48,54).

Unter den Paramunitätsinducern gibt es nur wenige reine Viruspräparate. Dazu gehören Bayferon^R (Präparat aus bovinem Herpesvirus; Fa. Bayer) und die aus Avipoxvirus- bzw. Parapoxvirusmaterial hergestellten Inducer PIND-Avi und PIND-Orf.

Beide Pockenpräparate liegen in inaktivierter bzw. teilinaktivierter Form vor und haben zudem hoch attenuierte, nicht virulente Virusstämme als Grundlage. Sie sind für die Umwelt vollkommen unschädlich und für alle untersuchten Säugetiere als gut verträglich einzuschätzen (76,98,111,117).

Die aus der Literatur bekannten Wirksamkeitsuntersuchungen sollen in Tabelle 6 zusammenfassend aufgelistet werden.

Tabelle 6 : Wirkungen von PIND-Avi und PIND-Orf auf unspezifische Abwehrfunktionen

nachgewiesene Funktion	Spezies	PIND-Avi	PIND-Orf	Literatur- hinweise
Wirksamkeit im				
-VSV-Infektionsmodell	Maus	++ [*]	+++	
-Aujeszkyvirus- Infektionsmodell	-"-	++	+++	
-Tumormodell (Osteosarkom)	-"-	++	++	
Serum-Interferon-Induktion	-"-	keine	++	
NK-Zellaktivität	-"-	++	++	
Lymphozyten- transformationstest	-"-	+	(+)	(76)
	Pferd	ja	ja	(36)
selektive T-Zell-Stimulation	Schwein	ja	n.u. ^{**}	(111)
	Mensch	ja	n.u.	(111,112)
Serum-CSA ^{***} -Induktion	Maus	ja	ja	(124)
Serum-TNF ^{****} -Induktion	Kaninchen	ja	ja	(72)

* Wirksamkeitsbeurteilung + ,++, +++;

** n.u. = nicht untersucht

*** CSA = "colony stimulating activity "

**** TNF = Tumor Nekrosis Faktor

Die Beurteilung der Wirksamkeit biologischer Paramunitätsinducer ist durch die Vielzahl der erzielbaren Regulationseffekte erschwert. Eine objektive Aussage über gleichzeitig induzierte synergistisch, wie antagonistisch wirkende Funktionen in vivo ist nicht möglich (73).

2.5. EXOGENE IFN-ZUFUHR ZUR BEKÄMPFUNG VON INFEKTIONS- KRANKHEITEN

Neben der Möglichkeit, den Organismus mit adäquaten Stimuli zur IFN-Produktion zu aktivieren, kann auch Interferon selbst zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten verwendet werden (9,73).

Erst die Gentechnologie gestattete es, die für diesen Einsatz benötigten IFN-Mengen in entsprechender Reinheit und zu akzeptablen Herstellungskosten bereitzustellen (54,56).

Einsatzbereiche in der Humanmedizin sind sowohl die Infektionsprophylaxe und -therapie, als auch die Bekämpfung von Tumorerkrankungen (82).

Die IFN-Applikation stellt den Therapeuten vor zwei Problembereiche.

Erstens: Welches Interferon eignet sich zur Behandlung einer bestimmten Virus- oder Tumorerkrankung?

Respiratory Syncytial-Virus (RSV) und Influenzavirus, zum Beispiel, induzierten in humanen Makrophagen Interferone mit unterschiedlichem antiviralem Spektrum. So zeigte das Influenzavirus-induzierte IFN auf verschiedenen Zellsystemen deutlich geringere Aktivität bei einer Influenzavirus-Infektion im Vergleich zum RSV-induzierten IFN (7).

In einem anderen Versuch produzierten unter identischen Induktionsbedingungen humane Monozyten und Lymphozyten unterschiedliche Mischungen aus IFN- α -Subtypen (102).

Die Potenz der einzelnen IFN- α -Subtypen hängt sowohl von der Produzentenzelle, als auch von der Zielzelle ab (43,102).

Akute Virusinfektionskrankheiten sprechen auf exogene IFN-Gaben besser an, als chronische (83).

Zweitens:

Der therapeutische Einsatz beim Menschen wird durch eine Reihe von Nebenwirkungen begrenzt.

Während natürliche Interferone in Dosierungen bis 10^6 antiviralen Einheiten/ m^2 Körperoberfläche "grippeartige" Symptome in unterschiedlicher Ausprägung hervorriefen, waren rekombinante IFN-Präparate in Dosierungen bis zu 10^{10} Einheiten/ m^2 leber-, nieren- und neurotoxisch. Die Schwere der Organschäden war dosisabhängig (13).

Weiteren Einfluß auf die klinische Toxizität übte die Applikationsart der Präparate aus: kontinuierliche intravenöse Verabreichung verursachte ausgeprägtere Nebenwirkungen, als einzelne i.v.- bzw. i.m.-Injektionen (13).

Tabelle 7 enthält die wichtigsten Nebenwirkungen der Interferon-Therapie beim Menschen: (nach Hellmeier, 1987) (37)

Tabelle 7 : Nebenwirkungen der IFN-Therapie

akut:	Hyperthermie, influenzaartige Symptome, lokale Entzündung (Injektionsstelle), Granulozytopenie, Lymphozytopenie.
subakut-chronisch: (nach Langzeit-Therapie)	reversible Granulo-, Thrombozytopenie, Leberenzymanstieg im Serum (ALT,AST), Haarausfall, Nausea, Anorexie, Gewichtsverlust, Psychosen, Halluzinationen, EEG-Aktivitätsabfall, periphere Parästhesien.

2.6. INTERFERON ZUR PROPHYLAXE UND THERAPIE IN DER VETERINÄRMEDIZIN

Die Indikationen für den Interferon-Einsatz in der Veterinärmedizin liegen in erster Linie in der Prophylaxe und Therapie multifaktorieller Infektionskrankheiten, wie z.B. der "crowding disease" der Rinder oder den Neugeborenenendiarrhoen bei Kälbern und Ferkeln (9,37).

Einige empirische Erfahrungen über die Beeinflussung des Verlaufes verschiedener Viruserkrankungen durch vorbeugende oder therapeutische IFN-Gaben liegen bereits vor (9,37).

So konnten bestimmte lokale (z.B. Papillomatose der Rinder) oder systemische Viruserkrankungen (z.B. Bovine Herpesvirus Typ 3 (BHV-3)-Infektion beim Rind) positiv durch exogene IFN-Gaben beeinflusst werden (37). Ein weiteres, allerdings seltenes Anwendungsgebiet deutet sich bei bestimmten Immundefizienzkrankheiten an (z.B. "severe combined immunodeficiency disease" SCID beim Araberfohlen) (128). Beim Kalb wirkte sich z.B. rekombinantes bovines IFN- α_1 in Dosierungen von 5 mg bis 10 mg pro Tier in der Prophylaxe, in Dosierungen von 1 mg bis 50 mg pro Tier in der Therapie einer BHV-1-Infektion, sowohl nach einmaliger intranasaler, als auch nach einmaliger i.m. Applikation mildernd auf den Krankheitsverlauf aus. Ferner konnte ein Absinken der Morbidität und Mortalität der behandelten Tiere im Vergleich zu unbehandelten Tiere festgestellt werden (5,61).

Die Tabellen 8 a und 8 b geben einen Überblick über die Erfahrungen mit dem Einsatz von Interferonen in Prophylaxe und Therapie einiger Virusinfektionskrankheiten.

Tabelle 8 a : Interferon in der veterinärmedizinischen Prophylaxe
(nach Hellmeier, 1987) (37)

infiziertes Organsystem	Tierart	Infektions- erreger	appliziertes IFN	Dosierung	Wirkung
Haut	Kalb	Vacciniavirus	rHuIFN- α	10^6 U ⁺ ./kg 2 x i.m. 7 x i.m.	Verzögerung des Krankheits ausbruches. Schutz
Respirations- trakt	---	BHV-1	rBoIFN- α_1 -1 HuIFN- α_2	5 mg/Tier 1 x i.nasal 4×10^6 U./kg mehrmals tgl. i.n./i.m.	milderer Verlauf Verzögerung, milderer Verlauf
Gastrointest.- Trakt	---	Rotavirus	IFN- α_2	10^6 U./kg mehrmals i.m.	Schutz oder milderer Verlauf
	---	BVD	rBoIFN- α_1 -1	10^4 - 10^6 U./kg i.m.	Verzögerung, milderer Verlauf
	Ferkel	TGE	rBoIFN- α_1 -1	4×10^8 U./Tier tgl. oral	keine Wirkung

(⁺ U. = antivirale Einheit)

Tabelle 8 b : Interferon in der veterinärmedizinischen Therapie
(nach Hellmeier, 1987) (37)

Infiziertes Organsystem	Tierart	Infektions- erreger	appliziertes IFN	Dosierung	Wirkung
Gastroint.- Trakt	Kalb	Rotavirus + E.Coli K99	rHuIFN- α	2 x 10 ⁷ U. [*] /kg 2 x tgl. über 3 - 5 Tg.	teils Heilung, teils ohne Wirkung
		Rota- und Coronavirus	rIFN- α	5 x 10 ⁶ bis 2 x 10 ⁷ U./kg oral	teils Heilung, teils Besserung
Haut	Rind	Papillomavirus	BoIFN	Paste mit 4000 mg/g lokal mehrmals tgl. über 4 - 6 Tage	Heilung
systemisch	---	BHV-3	BoIFN	1000-3000U./kg parenteral über 3 Tg. , lokal Augensalbe mit 4000mg/g, + symptomat. Therapie	nach 24 Std. fieberfrei

(* U. = antivirale Einheit)

Vor dem Einsatz potentiell interferonogener Paramunitätsinducer in der Veterinärmedizin hat man sich i.d.R. damit begnügt, die IFN-induzierenden Eigenschaften an kleinen Versuchstieren festzustellen. Aus Gründen vielfältiger Spezieeseigenarten, sowie bekannter Diversität in der Zusammensetzung antiviral bzw. immunregulatorisch wirksamer Zytokine ist es ratsam, zumindest in vitro die Effekte aussichtsreicher Immunmodulatoren so praxisnah wie möglich abzuklären.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Zellkulturtechnik, Virusvermehrung, - anreicherung und -titrationsmethoden

Zelllinien , Zellkulturmedien und Zellkulturbedingungen

MDBK(NBL-1): bovine Nierenzelllinie (ATCC * CCL- 22) (4);

(Mardin Darby Bovine Kidney ; frei von BVD/MD-Viruskontaminationen)

Als Zellkulturmedium wurde Earle's Minimal Essential Medium (E-MEM; Fa. Gibco) mit 8 - 12 mMol NaHCO_3 , 2 % fetalem Kälberserum (FKS; Flow Laboratories Inc., Rockville,USA), 100 I.E./ml Penicillin G (Fa. Hoechst AG, Frankfurt), 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (Fa.Grünenthal GmbH,Stolberg) und 4 $\mu\text{g/ml}$ Tylosin-Base (Fa. Elanco) benützt.

E.Derm.(NBL-6): equine Dermis (ATCC CCL-57)

Das Zellkulturmedium war, bis auf den höheren FKS-Anteil von 10 %, identisch zu dem der MDBK-Zellkultur.

WISH: humane Amnionzelllinie (ATCC CCL-25)

Das Zellkulturmedium bestand aus Eagle's Basal Medium (BME; Fa. Seromed, Biochrom KG, Berlin) mit 15 % FKS ohne Antibiotikazusätze.

Diese Zellkultur wurde im CO_2 -Brutschrank gehalten.

Alle Testzellen wurden regelmäßig auf Mycoplasmenfreiheit geprüft**

* American Type Culture Collection, Katalog 1988

** Dr. Kalau, Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Südbayerns, Oberschleißheim

Anzucht von Zellkulturen aus tiefgefrorenen Zellsuspensionen (77)

Eine Gefrierampulle (Fa. Nunc) mit der konservierten Zellsuspension wurde sofort nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37° C warmes Wasserbad überführt. Nach 2 - 3 min. wurde der verflüssigte Inhalt in 9 ml serumfreiem Zellkulturmedium aufgenommen und anschließend 7 min. bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das Zellsediment in 8 ml komplettem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Plastikzellkulturflasche (Falcon; Fa. Becton u. Dickinson) gefüllt. Ein dicht gewachsener Zellrasen wurde dann auf 75-cm²- und 150-cm²-Plastikzellkulturflaschen (Fa. Flow) überführt und bei 37° C bis zur Konfluenz angezüchtet.

Zur Weiterzucht in den 150 cm²- Zellkulturflaschen wurde das Zellse-
diment in folgenden Verhältnissen geteilt :

MDBK / E.Derm. : 1 : 3 bis 1 : 4 ,

WISH : 1 : 4 bis 1 : 6.

Die so geteilten Zellkulturen bildeten nach ca. 48 Stunden einen dichten Zellrasen.

Konservierung der Zellkulturen (77)

Die für die Tests (siehe 3.1.4. bis 3.1.6.) verwendeten Zellkulturen wurden für maximal 10 Passagen (Zellkulturpassage = Vermehrungszyklus von der Einsaat bis zur Teilung der Zellkultur) in Kultur gehalten. Der dichte Zellrasen der jeweils zehnten Passage wurde abtrysiniert und zentrifugiert (7 min./200 x g/Raumtemperatur). Das Zellsediment wurde in 3 ml Zellkulturmedium (mit 10 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid; DMSO) aufgenommen und in 1 ml-Portionen in Gefrierampullen (Fa. Nunc) abgefüllt.

Zur langsamen Abkühlung wurden die Röhrchen für etwa 4 Stunden in den Kühltank (+4° C)gestellt, anschließend wurden sie über Nacht bei -70° C gelagert. Zur endgültigen Lagerung wurden die Röhrchen in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter (-196° C) verbracht.

Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte nach der Trypanblaumethode, die gleichzeitig auch eine Zellvitalitätsbeurteilung ermöglicht (tote Zellen sind blau gefärbt (77)).

0,1 ml des in Zellkulturmedium (Volumen v) resuspendierten Zellsediments wurden mit 9,9 ml einer 0,05 %-igen Trypanblaulösung (Fa. Carl Roth OHG,Karlsruhe) gut vermischt. Die Auszählung wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mikroskopisch (Vergrößerung 400-fach) vorgenommen, wobei jeweils 16 kleine Zählquadrate diagonal von oben links nach unten rechts durchgemustert wurden.

Das Volumen der Zellsuspension, das man bei einer gewünschten Zellkonzentration/ml aus dem im Volumen v vorverdünnten Zellsediment erhält, berechnet sich aus folgender Formel :

Verdünnungsfaktor/Sediment =

$$= \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times 5 \times 1000 \times \text{Vorverdünnung des Zellsediments (v)}}{\text{gewünschte Zellzahl}}$$

Virusvermehrung

Die Virusvermehrung wurde auf dichten Zellkulturen in 150-cm²- Zellkulturflaschen durchgeführt.

Nach dem Abkippen des Zellkulturmediums wurde das entsprechende Virusmaterial in einer Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle (multiplicity of infection ; MOI) zwischen 1 und 3 inokuliert, anschließend erfolgte die Zugabe von 15 ml serumfreiem Zellkulturmedium und die Inkubation der infizierten Zellkultur für eine Stunde bei 37° C zur Virusadsorption.

Danach wurde das Volumen mit 25 ml des entsprechenden, die Hälfte des normalen Serumanteils enthaltenden Zellkulturmediums aufgefüllt und die Zellkultur bis zur Ausbildung eines vollständigen zytopathogenen Effektes (cpE) bei 37° C inkubiert.

Die Beurteilung des cpE erfolgte mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung.

Zellkulturen mit einem vollständig ausgebildeten cpE wurde bei -70° C tiefgefroren.

Nach dem Auftauen wurde das virushaltige Medium für 10 min. bei 950 x g und 4° C zur Beseitigung grober Zelltrümmer zentrifugiert, zu je 2 ml in 8-ml-Plastikschraubröhrchen (Fa. Nunc) abgefüllt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20° oder -70° C gelagert (77).

Virusanreicherung

Eine Einengung von equinem Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) - und Newcastle Disease Virus (NDV)-Suspensionen erfolgte durch Ultrazentrifugation.

EHV-1-Suspensionen wurden für 1 1/2 Stunden bei 105.000 x g und +4° C, NDV-Suspensionen für zwei Stunden bei 175.000 x g und +4° C in einer Beckman LT-55 Ultrazentrifuge sedimentiert. Das Viruspellet wurde in einem Zehntel des Ausgangsvolumens mit Tris-Puffer (1 mMol/l; Fa. Boehringer, Mannheim) gründlich resuspendiert und in 1 ml-Portionen in 8-ml-Plastikschraubröhrchen bei -70° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Virustitration in Zellkulturröhrchen

Die Bestimmung der KID₅₀/ml der EHV-1 -, BHV-1 - und NDV-Suspensionen erfolgte jeweils auf homologen Organzellkulturen bzw. Zelllinien.

Von der zu titrierenden Virussuspension wurde mit gekühltem, serum-freiem Zellkulturmedium eine log 10-Verdünnungsreihe angelegt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden, nachdem man das Zellkulturmedium der Monolayer aus den Röhrchen dekantiert hatte, jeweils 0,1 ml auf je vier der dicht bewachsenen Zellkulturröhrchen überimpft und anschließend jeweils 2 ml Erhaltungsmedium zugefügt.

Die beimpften Zellkulturen in den Röhrchen wurden bei 37° C inkubiert und die Entwicklung des cpE wurde täglich mikroskopisch (400-fache Vergrößerung) beurteilt.

Die Endablesung wurde zum Zeitpunkt des deutlich erkennbaren und nicht mehr weiter fortschreitenden cpE festgelegt.

Virustitration in 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten

Virusernten von Stomatitis Vesicularis Virus (VSV), EHV-1 und BHV-1 wurden im selben Zellsystem austitriert, in dem die Virusvermehrung durchgeführt wurde.

Je 50 µl der Zellsuspension (verwendete Zellzahl/ml siehe Tabelle 9) und je 50 µl des entsprechenden Zellkulturmediums wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) gegeben und nach Durchmischung auf einem Mikrotiterplattenrüttler und Versiegelung mit steriler Plastikklebefolie (Fa. Nunc), bei 37° C inkubiert, bis die Zellen zu Monolayern ausgewachsen waren (i.d.R. 24 Stunden).

Nach Herstellung von Verdünnungsreihen der zu titrierenden Virus-suspensionen, wurde das Medium der Zellrasen abgekippt und je 50 µl jeder Verdünnungsstufe in identischen Vierergruppen einpipettiert.

Nach einstündiger Virusadsorption im Brutschrank wurden pro Vertiefung noch 100 µl Zellkulturmedium zugegeben und die Platte bis zur Endablesung inkubiert.

Die Endablesung erfolgte bei VSV-Titrationen 24 Stunden post infectionem nach Färbung und Fixierung der Zellen, wie in 3.1.4.4. beschrieben wird.

Die Entwicklung des cpE bei der Titration von EHV-1 und BHV-1 wurde täglich mikroskopisch kontrolliert. Die Endablesung wurde zu dem Zeitpunkt festgelegt, ab dem kein Fortschreiten des cpE mehr feststellbar war.

Tabelle 9 : Einsaatkonzentrationen der Zellsuspensionen für die Virustitrationen in Mikrotiterplatten

Virustitration log 10	Einsaatkonzentration (Zellen/ml)	Zellkultur
VSV	1×10^6	MDBK E.Derm. WISH
EHV-1	3×10^5	E.Derm.
BHV-1	$1,5 \times 10^5$	MDBK
	5×10^5	sek. bovine fetale Nieren- Zellkultur (BEK)

3.1.1.1. Herstellung equiner mononukleärer Leukozytenkulturen

Gewinnung von equinen mononukleären Leukozyten aus peripherem Blut
(equine peripheral blood mononuclear leucocytes ; equ.PBML)

Probanden:

Folgende Pferde dienten als Blutspender:

1	Bayr. Warmblut, wbl., 11 Jahre	
2	Bayr. Warmblut, wbl., 2 Jahre	
3	Haflinger, wbl., 7 Jahre	Institut für Mikrobiologie
4	Haflinger, männl., 10 Jahre	Privatbesitz
5	Haflinger, männl., 4 Jahre	
6	Trakehner, Wallach, 15 Jahre.	

Der Gesundheitszustand sämtlicher Spendertiere war zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht beeinträchtigt.

Die institutseigenen Tiere (1 bis 3) wurden regelmäßig gegen Pferdeinfluenza und Tetanus geimpft, sowie gegen Endoparasiten behandelt. Haltungs- und Fütterungsbedingungen dieser Tiere waren identisch.

Hinsichtlich der Fütterungs- und Haltungsbedingungen der übrigen Tiere waren keine ausreichenden Informationen erhältlich.

Im Zeitraum der Blutentnahmen hatten serologische Untersuchungen auf neutralisierende Antikörper gegen equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) folgendes Ergebnis :

Pferd Nr.	EHV-1-Antikörpertiter
1	1 : 32
2	1 : 4
3	1 : 8
4	1 : 4
5	neg.
6	1 : 4

Blutentnahme:

Nach der Punktion der Vena jugularis (Kaniüle 1.50 x 40 mm) wurden ca. 100 ml Blut in einer Schraubflasche mit 10 ml 2,7%-igem(w/v) Na-EDTA (Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg) aufgenommen und 45 bis 60 min. bei Raumtemperatur stehengelassen.

Separierung der equinen mononukleären Leukozyten (equ.PBML):

Die Separierung der equinen mononukleären Leukozyten erfolgte modifiziert nach YILMA (128) über die Fikoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation (15).

Der leukozytenreiche Plasmaüberstand ("buffy coat"), sowie die oberste Schicht des Erythrozytensediments wurde abpipettiert und mit kalter Ca^{2+} und Mg^{2+} -freier PBS (phosphat buffered saline; Fa Seromed, Biochrom KG, Berlin) im Verhältnis 1:2 verdünnt. In 50 ml Glaszentrifugenröhrchen überschichtete man jeweils 20 ml der Leukozytensuspension auf 20 ml Fikoll-Trennlösung (Dichte $1,077 \text{ g/cm}^3$; Fa.Seromed, Biochrom KG, Berlin) und zentrifugierte 40 min. bei 400 g und Raumtemperatur. Die an der Phasengrenze Fikoll/Plasma produzierte Zellbande mononukleärer Leukozyten wurde geerntet, in 250 ml Glaszentrifugengefäße überführt, mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier PBS im Verhältnis 1:5 verdünnt und anschließend 15 min. bei 400 g zentrifugiert. Danach wurde das Zellsediment in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier PBS resuspendiert, das Volumen auf 40 ml aufgefüllt und 10 min. bei 350 g zentrifugiert. Nach der Wiederholung des letzten Reinigungsschrittes nahm man das Zellsediment in 2 ml Zellkulturmedium (RPMI 1640; Fa. Seromed, Biochrom KG, Berlin; mit 10% FKS, 100 I.E./ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 2,5 mMol/l HEPES-Puffer*) auf. Die Zellzählung und Zellvitalitätsprüfung erfolgten mittels Trypanblaufärbung. Die Gesamtausbeute an mononukleären Leukozyten aus 100 ml Vollblut betrug gewöhnlich $1 - 2,5 \times 10^8$ Zellen. Anschließend wurde die PBML-Zellsuspension mit Zellkulturmedium auf $2,25 \times 10^7$ Zellen / ml eingestellt.

Für einige Versuche wurden humane PBML aus venösem Vollblut mit Heparinzusatz (10 U./ml) ebenfalls nach der Fikoll-Hypaque-Dichtegradienten-Trennung hergestellt (15).

*

Fa. Serva

3.1.1.2. Herstellung primärer fetaler boviner Nierenzellkulturen (bovine embryonic kidney, BEK)

Organkulturen (Niere) aus Rinderfeten

Rinderfeten wurden als Konfiskate im Rahmen der amtlichen Fleischbeschau am Schlachthof München zur Verfügung gestellt.

Aus den Nieren von 18 Rinderfeten folgender Entwicklungsstadien wurden Zellkulturen angelegt:

Tabelle 10 : Entwicklungsstadien der Rinderfeten

Anzahl	Scheitel-Steiß-Länge in cm	ungefähres Alter in Wochen post conceptionem (6)
2	20	14
4	25	16
4	30	18
2	35	20
5	40	22
1	70	32

Die sterile Entnahme der fetalen Nieren wurde etwa 4 bis 8 Stunden nach der Konfiszierung der Feten vorgenommen.

Capsula adiposita und Capsula fibrosa wurden entfernt und die Nierenrinde in kleinen Stücken abgetrennt. Nach der groben Zerkleinerung der Gewebestücke erfolgte die Überführung in einen sterilen Erlenmeyerkolben. Die weitere Aufbereitung der Gewebe wurde mit der üblichen Trypsinierungsmethode (77) durchgeführt.

Es wurden, je nach Zellbedarf, zwei bis vier Trypsiniervorgänge vorgenommen.

Die gesammelte, grob filtrierte (8-fach Gaze) primäre fetale Rindernieren(BEK)-Zellsuspension wurde für 7 min. bei 200 x g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in 10 bis 20 ml Zellkulturmedium (E-MEM, mit 5 - 8 % FKS, 5 - 8 % Lactalbumin*) für die Zellzählung vorverdünnt.

Je 20 ml der auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellte BEK-Zellsuspension wurde in Glas-Vierkant-Zellkulturflaschen überführt und bis zur Konfluenz des Zellrasens bei 37° C inkubiert.

*

Fa. Difco

3.1.2. Behandlung von equinen PBML und primären BEK-Zellkulturen zur Synthese extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirkender Substanzen

3.1.2.1. Induktion equiner PBML-Kulturen

In 8 ml-Plastikschraubröhrchen (Fa. Nunc) wurde jeweils 1 ml der auf $2,25 \times 10^7$ Zellen / ml eingestellten equ.PBML-Suspension mit 1 ml der entsprechenden, mit serumfreiem Zellkulturmedium auf die gewünschte MOI / ml eingestellten Induzentensuspension vermischt, und 1 Stunde bei 37°C im CO_2 -Brutschrank unter ständiger leichter Bewegung inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert ($350 \times g/10$ min./Raumtemp.) und mit Zellkulturmedium auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ / ml (Gesamtvolumen 15 ml) eingestellt. In drei 60-mm-Plastik-Petrischalen (Fa. Greiner) wurden je 5 ml dieser Zellsuspension ausgesät und im CO_2 -Brutschrank bis zur Ernte der Zellkulturüberstände inkubiert.

3.1.2.2. Induktion primärer BEK-Zellkulturen

Das Zellkulturmedium der dichten BEK-Kulturen wurde dekantiert und je 1 ml der mit serumfreiem Medium auf die gewünschte MOI / ml eingestellte Induzentenlösung* einpipettiert. Anschließend wurden je 5 ml serumfreies Zellkulturmedium zugegeben, das Zellkulturgefäß vorsichtig zur gleichmäßigen Verteilung des Inokulums auf dem Zellrasen geschwenkt und der Zellrasen zur Adsorption für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Danach wurde das Inokulum dekantiert, mit warmer PBS vorsichtig nachgespült und je 20 ml Erhaltungsmedium (E-MEM, + 2 % FKS) zugegeben. Bis zur Ernte der Zellkulturüberstände wurden die Zellkulturgefäße bei 37°C inkubiert.

* Vor Berechnung der MOI wurde die Zellzahl einer dichten BEK-Kultur bestimmt.

3.1.2.3. Viren und Viruspräparate zur Zellkultur-Induktion

Newcastle Disease Virus (NDV)

Behülltes, einsträngiges RNS-Virus, Familie Paramyxoviridae, Genus Paramyxovirus (69).

Verwendet wurde der lentogene Stamm Hitchner B₁ (Institutssammlung), 9. Eipassage. Die Virussuspension (Allantoisflüssigkeit) wurde, wie in 3.1.1.4. beschrieben, konzentriert und hatte auf Hühnerembryo-Fibroblastenkulturen (FHE) einen Titer von $10^{9,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$. Die Aktivität im Limulus E-Toxate^R Test betrug 6 - 19,2 E.U./ml.

Equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1)

Behülltes doppelsträngiges DNA-Virus, Familie Herpesviridae, Genus Alphaherpesvirus (69).

Es wurde der an Hamster adaptierte und auf embryonalen Schweinenieren (ENS) attenuierte Impfstamm Rac-H (75,126) als 263. ENS, 13. rabbit kidney (RK)₁₃, 3. E.Derm. - Passage verwendet.

Die konzentrierte Virussuspension hatte einen Titer von $10^{7,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ vor. Die Aktivität im Limulus E-Toxate^R Test betrug 192 - 600 E.U./ml.

Parapoxvirus ovis

Behülltes doppelsträngiges DNA-Virus, Familie Poxviridae, Subfamilie Chordopoxvirinae, Genus Parapoxvirus (69).

Verwendet wurde der attenuierte Stamm D 1701 (77) in der 135. embryonalen Niere Lamm (ENL), 38. bovinen embryonalen Lunge (BEL)-Passage.

Die gereinigte Virussuspension hatte den Titer $10^{8,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$, die Aktivität im Limulus E-Toxate^R Test betrug 192 - 600 E.U./ml.

Avipoxvirus gallinae

Behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus, Familie Poxviridae, Subfamilie Chordopoxvirinae, Genus Avipoxvirus (69)

Der verwendete attenuierte Hühnerpockenvirus-Stamm HP-1 438 wurde in der 441. Hühnerembryofibroblasten (FHE)-Passage freundlicherweise von der Fa. Thomae zur Verfügung gestellt. Der Titer betrug $10^{7,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$, die Aktivität im Limulus E-Toxate^R Test 60 - 192 E.U./ml.

Paramunitätsinducer PIND-Orf T (hitzebehandelt)

Es handelt sich hierbei um ein im Institut hergestelltes Präparat aus attenuiertem, auf sekundären BEL-Zellkulturen vermehrten und hitzebehandelten (2 1/2 Stunden bei 56° C) Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701 (76).

Dem Präparat sind 2,5 % succylierter Gelantine (Gelofusine, Laboratories Hausman Inc., St. Gallen) als Stabilisator zugesetzt. Das flüssige Präparat ist auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt und in 2 ml Portionen lyophilisiert.

Jeweils kurz vor der Anwendung wurde das lyophilisierte Pulver in 2 ml sterilem pyrogenfreiem aqua injectabilia (Ampuwa^R; Fa. Fresenius) aufgelöst.

Die Titer der verwendeten Chargen 042 T und 047 T vor der Hitzebehandlung betrugen $10^{7.75}$ bzw. $10^{7.5}$ KID₅₀/ml, Resttiter von 10^1 bzw. $10^{3.5}$ KID₅₀/ ml wurden nach der Hitzeinwirkung ermittelt.

Paramunitätsinducer PIND-Orf β -PL (β -Propiolacton-inaktiviert)

Dieses Präparat wird ebenfalls im Institut aus attenuiertem, auf sekundären BEL-Zellkulturen vermehrten Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701 hergestellt.

Das Ausgangsmaterial wurde zunächst mit 1 N NaOH (Fa. Merck) auf pH 8 eingestellt. Dann wurde β -Propiolakton (C₃H₄O₂, Fa. Serva; β -PL) in einer 1 : 10 - Verdünnung in pyrogenfreiem aqua inject. (Ampuwa^R) der Virussuspension bis zu einer Endkonzentration von 0,06 % zugesetzt. Nach einer Inkubation von 30 Min. bei +4° C folgte eine 3-stündige Inkubation bei 37° C unter ständiger Umwälzung der Flüssigkeit. Die Konstanthaltung des pH-Wertes 7,4 (Indikator: Phenolrot) wurde durch laufende, tropfenweise Zugabe von 1 N NaOH garantiert. Schließlich wurde die β -Propiolakton behandelte Pockenvirussuspension eine Nacht im Kühlschrank gelagert und dann bei 400 x g 15 min. lang zentrifugiert. Zur weiteren Lagerung bei + 4° C wurde der klare Überstand durch vorsichtiges Abpipettieren vom Bodensatz getrennt; der Bodensatz und die Flüssigkeit direkt darüber wurden verworfen.

Proben der β -PL behandelten Virussuspension wurden elektronenoptisch beurteilt und in der empfindlichsten Zellkultur (Glas-Zellkulturröhrchen a 2 ml) angeimpft. Falls bei der Virusanzucht nach 5 Tagen kein zytopathogener Effekt (cpE) festgestellt wurde, wurden nach Gefrier-Tauen (3 x) noch zwei weitere Blindpassagen durchgeführt.

Der Titer des infektiösen Ausgangsmaterials betrug $10^{7,5} \text{KID}_{50}/\text{ml}$, ein Resttiter nach der Inaktivierung war nicht festzustellen.

Paramunitätsinducer PIND-Avi

Das aus attenuiertem, auf primären FHE-Zellkulturen vermehrten, durch γ -Bestrahlung inaktivierten (14.000 Gy; GSF, München, Neuherberg) Hühnerpockenvirus, Stamm HP-1 438, hergestellte Präparat (siehe PIND-Orf T), liegt ebenfalls als lyophilisiertes Pulver vor, das jeweils kurz vor der Verwendung in 2 ml sterilem, pyrogenfreiem aqua inject. gelöst wurde.

Der infektiöse Ausgangstiter der verwendeten Charge 196 betrug $10^{7,75} \text{KID}_{50}/\text{ml}$, ein Resttiter nach der γ -Inaktivierung war nicht meßbar.

Kontrollen

Zellkontrolle:

Als Zellkontrollen dienten equ.PBML- und primäre BEK-Kulturen, die, statt mit den jeweiligen Induzenten, nur mit entsprechenden Volumina des Zellkulturmediums überschichtet wurden.

Lipopolysaccharid-Kontrolle:

Equ.PBML- und primäre BEK-Kulturen wurden mit einer E.coli-Standard-Endotoxinlösung (Stock Nr.: 210 SE; Fa. Sigma, Deisenhofen) in derjenigen Konzentration behandelt, die dem höchsten LPS-Gehalt der eingesetzten Induzenten entsprach (600 E.U./ml).

Dazu wurde das lyophilisierte Pulver in 5 ml endotoxinfreiem Wasser (Fa.Sigma) gelöst (Stammlösung mit 400 ng Endotoxin/ml). 1 ng Endotoxin entspricht 6 Endotoxin Units (E.U.).

Ein ml der Stammlösung (400 ng/ml = 2.400 E.U./ml) wurde mit serumfreiem Zellkulturmedium im Verhältnis 1 : 4 zur Endkonzentration von 600. E.U./ml verdünnt.

Die folgenden Tabellen sollen einen Überblick der Induktionsprotokolle für equine periphere mononukleäre Leukozyten(equ.PBML)- und primäre bovine embryonale Nieren(BEK)-Zellkulturen geben:

Tabelle 11 a: Behandlung von equ.PBML-Kulturen zur Induktion extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirksamer Substanzen

Zellkultur	eingesetzte MOI der Induzenten (attenuierte Virusstämme)			
	NDV	EHV-1	Parapox	Avipox
equ.PBML				
	-	-	0,1	0,1
	-	0,5	-	0,5
	1	1	1	1
	-	-	5	-
	10	-	-	10
	100	-	-	-

Tabelle 11 b: Behandlung von BEK-Organzellkulturen zur Induktion extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirksamer Substanzen

Zellkultur	eingesetzte MOI der Induzenten (attenuierte Virusstämme)			
	NDV	EHV-1	Parapox	Avipox
BEK				
	0,1	0,1	0,1	0,1
	-	0,5	-	0,5
	1	1	1	1
	-	5	5	-
	10	10	10	10
	50	-	-	-
	100	-	-	-

Tabelle 11 c : Behandlung von equ.PBML- und BEK-Organzellkulturen zur Induktion extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirksamer Substanzen

Zellkultur	eingesetzte MOI der Induzenten (Paramunitätsinducer)		
equ.PBML / BEK	PIND-Orf T	PIND-Orf B-PL	PIND-Avi
	0,1	0,1	0,1
	0,5	0,5	0,5 ⁺
	1	1	1
	5	5	5
	10 ⁺⁺	-	-
(⁺	nur auf equ.PBML-Kultur;		
⁺⁺	nur auf BEK-Organzellkultur)		

Die Induktion humaner PBML wurde mit PIND-Orf B-PL in der MOI 1 durchgeführt.

3.1.2.4. Gewinnung und Behandlung von Zellkulturüberständen (ZKÜ)

ZKÜ-Gewinnung

Die Ernte der Überstände induzierter equ.PBML- und primärer BEK-Kulturen erfolgte 24, 48 und 72 Stunden post inductionem.

Der gesamte equ.PBML-Kulturüberstand der jeweils für eines der Probenintervalle angelegten Petrischalen, bzw. 5-ml-Aliquots des Zellkulturüberstandes der BEK-Kulturen (das entnommene Volumen wurde durch Zugabe frischen Erhaltungsmediums ersetzt) wurde über 7 min. bei 200 x g (Raumtemperatur) zentrifugiert.

Der Überstand wurde in 10-ml-Polystyrolröhrchen (Fa. Greiner) gefüllt und im Kühlschrank (+4°C) bis zur weiteren Verwendung gelagert.

pH 2-Behandlung

Um den pH-Wert der Überstände induzierter Zellkulturen von pH 7,2 bis 7,4 auf Werte um pH 2 abzusenken, versetzte man 2 ml der Überstände mit 65 μ l 1 n HCl (Fa. Merck, Darmstadt). Die so behandelten Proben wurden für 3 - 5 Tage im Kühlschrank gelagert, bevor sie mit je 60 - 65 μ l 1 n NaOH (Fa. Merck) wieder auf einen pH-Wert von 7,2 bis 7,4 eingestellt wurden

Die Kontrolle der pH-Werte erfolgte mit Spezialindikatorpapier (Fa. Merck).

3.1.2.5. Kombinierte Prä-Induktion ("Priming") und Induktion equiner PBML-Kulturen

Zur Prä-Induktion benutzte Substanzen ("Primer")

Nachfolgend sind die zur Prä-Induktion verwendeten Substanzen in den jeweiligen Konzentrationen bzw. MOI's aufgelistet :

"Primer"	verwendete Konzentration bzw. MOI		
Zellfreier NDV-induzierter equ.PBML-ZKÜ	0,5 I.U./ml Zellsuspension		
	1,0 I.U./ml "-"		
NDV	MOI	0,5	(= $10^{7,2}$ KID ₅₀ /ml)
	MOI	0,1	(= $10^{6,5}$ KID ₅₀ /ml)
PIND-Orf 042 T	MOI	0,1	(= $10^{6,5}$ KID ₅₀ /ml)
	MOI	0,5	(= $10^{7,2}$ KID ₅₀ /ml)
	MOI	1	(= $10^{7,5}$ KID ₅₀ /ml)

Prä-Induktion ("Priming") equiner mononukleärer Leukozyten

Equine PBML in 20 ml, eingestellt auf $1,5 \times 10^6$ Zellen / ml, wurden mit 1 ml der auf die gewünschte Konzentration bzw. MOI eingestellten Primer-Substanz gemischt und für zwei Stunden auf einem Magnetrührer bei 37°C im CO_2 -Brutschrank inkubiert.

Weiterbehandlung prä-induzierter equ.PBML

Die equ.PBML wurden abzentrifugiert (7 min./200 x g/Raumtemperatur), in 1 ml serumfreiem Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend auf Zahl und Vitalität geprüft (nur Zellsuspensionen mit über 95 % lebenden Zellen wurden weiterverwendet).

In der Tabelle 12 sind die Prä-Induktion und nachfolgende Induktion equiner PBML zusammengestellt:

Tabelle 12 : Prä-Induktion und Induktion equiner PBML

"Primer"	Induzenten			
	Konzentration/ MOI		NDV	Parapoxvirus ovis
equ.PBML-ZKÜ (NDV-induziert)	0,5 I.U./ml	}	MOI 10	{ MOI 0,5 MOI 1
	1,0 I.U./ml			
NDV	MOI 0,1	{	MOI 1	-
			MOI 10	
Parapoxvirus ovis	MOI 0,1		-	MOI 10
PIND-Orf 042 T	MOI 0,1	}	MOI 0,5	-
	MOI 0,5			
	MOI 1			

Die Gewinnung zellfreier Überstände erfolgte 24 bzw. 48 Stunden post inductionem.

Kontrollen

Folgende Kontrollkulturen wurden bei jedem "Priming"-Versuch mit angelegt:

Zellkontrolle:

equ.PBML-Kultur ohne "Primer" und Induzent;

"Priming"-Kontrolle:

equ.PBML-Kultur, die nur mit der entsprechenden Menge der jeweiligen "Primer"-Substanz behandelt wurde.

Induzenten-Kontrolle:

equ.PBML-Kultur, die nur mit dem entsprechenden Induzenten in angegebener MOI beimpft wurde.

Alle Kontrollkulturen wurden ansonsten wie die Versuchskulturen behandelt.

3.1.3. Nachweis der antiviralen Aktivität im Überstand induzierter Zellkulturen

3.1.3.1. Testprinzip

Grundlage dieses Tests ist die Aufhebung bzw. Reduktion des zytopathogenen Effektes (cpE) auf virusbelasteten Testzellen durch Zellkulturüberstände mit ausreichender antiviraler Aktivität (27,68). Die Bewertung der cpE-Reduktion erfolgt makroskopisch nach Anfärbung des Zellrasens (1,47).

Verwendete Testzellen

Als Testzellen fanden die Zelllinien MDBK, E.Derm. und WISH Verwendung, wobei zur Kultivierung die bereits beschriebenen Methoden eingesetzt wurden; lediglich bei der humanen Amnionzelllinie WISH wurde der FKS-Zusatz auf 5 % reduziert.

Belastung mit Stomatitis vesicularis Virus (VSV)

Als Belastungsvirus wurde VSV (Rhabdovirus) benutzt.

Der Virusstamm "Indiana" (11. FHE) wurde auf jeder der drei Testzellen vermehrt und in folgenden Passagen verwendet:

11. FHE, 1. - 3. MDBK ,

11. FHE, 1. E.Derm. ,

11. FHE, 1. WISH .

Bestimmung der VSV-Belastungsverdünnung

Jede der VSV-Passagen wurde auf der entsprechenden Testzelle, wie bereits in 3.1.1. beschrieben, ausstitriert.

Die optimale VSV-Gebrauchsverdünnung entsprach der letzten Verdünnungsstufe, bei der alle vier Vertiefungen einen noch vollständig lytischen cpE zeigten.

Die in jedem Test angelegten Zellkontrollen wurden statt mit 50 µl VSV-Gebrauchsverdünnung mit 50 µl Zellkulturmedium überschichtet.

Verdünnungsreihe der zu testenden Zellkulturüberstände

Nach Vorlage von je 50 µl des geeigneten Zellkulturmediums ab Lochreihe B einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Fa.Nunc) wurde, nachdem in Lochreihe A pro Vertiefung 100 µl des zu testenden Zellkulturüberstandes einpipettiert waren, durch Überheben von jeweils 50 µl mit einer 12-Kanal-Pipette (Fa.Dynatech) eine log 2-Verdünnungsreihe (Vol. = 50 µl) der Zellkulturüberstände hergestellt.

Einsaat der Testzellkultur

Die Testzellen einer dicht gewachsenen 150 cm²-Plastikzellkulturflasche (Flow Laboratories, Inc.) wurden abtrypsiniert und auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. In jedes Loch der Mikrotiterplatte wurden 50 µl dieser Zellsuspension auf die ZKÜ-Vorverdünnungen (50 µl) pipettiert und die Platte, nach kurzer Durchmischung auf dem Mikrotiterplattenrüttler, mit steriler Plastikfolie versiegelt und für 24 Stunden (bis der Zellrasen dicht gewachsen war) im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Virusbelastung zum Nachweis antiviraler Aktivität

24 Stunden nach der Einsaat in die Test-ZKÜ's wurde der Überstand der Monolayer dekantiert und pro Loch je 50 µl der VSV-Belastungs-Gebrauchsverdünnung zugegeben. Zur Virusadsorption wurde die versiegelte Mikrotiterplatte eine Stunde lang inkubiert (37° C/ CO₂). Anschließend wurden je 100 µl Zellkulturmedium beigefügt und, nach Versiegelung der Platte, für weitere 24 Stunden inkubiert.

Fixierung und Färbung

Zur makroskopischen Auswertung eines Testes wurde der Zellrasen der Mikrotiterplatten mit je 100 µl 5 %-iger Formalinlösung (Fa. Merck, Darmstadt) (in PBS) für eine Stunde fixiert.

Nach der Fixierung erfolgte die Anfärbung des Zellrasens mit je 50 µl Kristall-Gentianaviolett pro Vertiefung (1:3 mit PBS verdünnt, pH 7,4) für ca. 10 Minuten.

Testkontrollen

Jeden Test begleiteten folgende Kontrollen:

Zellkontrolle:

Statt des zu testenden Zellkulturüberstandes (ZKÜ) und der VSV-Gebrauchsverdünnung, wurden nur entsprechende Volumina an Zellkulturmedium eingesetzt.

Viruskontrolle:

In nur mit Medium angezüchteten, dichten Zellrasen (je zwei Vertiefungen) wurden die VSV-Belastungsverdünnung und eine VSV-Weitertitration (log 2-Verdünnungen) überprüft.

Interferon-Laborstandard:

log 2-Verdünnung des auf 200 U./ml eingestellten Labor-Referenz-Interferons (rHuIFN-alpha; Fa. Boehringer, Wien) wurden mit den Testzellen inkubiert und diese dann der VSV-Belastung ausgesetzt.

Induzenten-Kontrolle:

Statt eines zu testenden ZKÜ, wurde eine Induzentenverdünnung, die der Konzentration des Induzenten in diesem ZKÜ entspricht, eingesetzt und 24 Stunden später die VSV-Belastung durchgeführt.

3.1.3.2. Grundlagen der Testauswertung

Definition:

Eine Einheit (1 Unit) antiviraler Aktivität verursacht eine cpE-Reduktion um 50 % (84).

Bestimmung des antiviralen Titers (in experimentellen Units E.U./ml):

Nachdem das Volumen eines potentiell antiviral wirksamen Zellkulturüberstandes 50 µl betrug, läßt sich seine antivirale Aktivität in experimentellen Einheiten (experimental Units; E.U.)/ml wie folgt berechnen :

E.U./ml = 20 x reziproker Wert der Verdünnungsstufe, bei dem der VSV-cpE noch zu 50 % gehemmt ist.

Wenn bei einer Verdünnungsstufe eine 100 %-ige cpE-Reduktion auftrat und die nächst folgende ZKÜ-Verdünnung keinerlei antiviralen Effekt mehr bewirkte, so galt der Mittelwert beider Verdünnungsstufen als 50 %-Endpunkt.

3.1.3.3. Standardisierung der Testwerte

NIH* - Referenz-Interferon :

Alle erhaltenen antiviralen Titer wurden auf das NIH-Referenz-Interferon, rekombinantes humanes Interferon- α_2 (rHuIFN- α_2), Katalog Nummer Gxa01-901-535, bezogen (87).

Das lyophilisierte Pulver (9.000 International Units I.U. / Ampulle) wurde in 1 ml sterilem aqua dest. gelöst, mit 9 ml E-MEM (+ 2% FKS) im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und in 1 ml-Portionen bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Diese Stammlösung (900 I.U./ml) wurde dann mit entsprechendem Zellkulturmedium vor der ersten Anwendung im Verhältnis 1 : 4,5 verdünnt (200 I.U./ml) und während der gesamten Testperiode bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Standardisierung des Labor-Referenz-Interferons :

Pro Testzell-Linie wurden fünf zeitlich voneinander unabhängige Tests der antiviralen Aktivität des NIH-Referenz-Interferons (200 I.U./ml) und des rekombinanten humanen Labor-Referenz-Interferon- α (200 E.U./ml; Fa. Boehringer, Wien) durchgeführt.

Für jedes Testzellsystem gesondert wurden die geometrischen Mittelwerte $\bar{g}$ der antiviralen Titer (in E.U./ml) der beiden Referenz-Interferone aus den fünf Tests ermittelt.

*

National Institute of Health

Die antivirale Aktivität des Labor-Referenz-Interferons in I.U./ml auf jeder der drei Testzelllinien wurde mit folgender Formel (I) berechnet :

$$\frac{\log(\text{NIH-Referenz I.U./ml})}{\log(\bar{g} \text{ NIH-Referenz E.U./ml})} \times \log(\bar{g} \text{ Labor-Referenz E.U./ml}) = \log(\text{Labor-Referenz I.U./ml}) \quad (I)$$

(87)

Standardisierung der antiviralen Titer der getesteten Zellkulturüberstände :

Folgende Formel (II) diene zur Umrechnung der antiviralen Aktivität der einzelnen Zellkulturüberstände von experimentellen Einheiten (experimental Units; E.U.)/ ml in internationale Einheiten (international Units; I.U.)/ml :

$$\frac{\log(\text{Labor-Referenz I.U./ml})}{\log(\bar{g} \text{ Labor-Referenz E.U./ml})} \times \log(\bar{g} \text{ ZKÜ E.U./ml}) = \log(\text{ZKÜ I.U./ml}) \quad (II)$$

(87)

3.1.3.4. Ermittlung der Sensitivitätsunterschiede der verwendeten Testzelllinien

Die standardisierten antiviralen Titer gleicher Zellkulturüberstände auf den drei verschiedenen Testzellsystemen wurden gegenübergestellt und die prozentuale Differenz der antiviralen Titer auf E.Derm. und Wish in I.U./ml relativ zu den Titern in I.U./ml auf MDBK (sensitivste Zelle) nach folgenden Formeln (III und IV) errechnet:

mittlerer Sensitivitätsunterschied

MDBK zu E.Derm in %

=

$$\frac{\text{I.U./ml}_{\text{MDBK}} - \text{I.U./ml}_{\text{E.Derm.}}}{\text{I.U./ml}_{\text{MDBK}}} \times 100 \quad (\text{III})$$

mittlerer Sensitivitätsunterschied

MDBK zu WISH in %

=

$$\frac{\text{I.U./ml}_{\text{MDBK}} - \text{I.U./ml}_{\text{WISH}}}{\text{I.U./ml}_{\text{MDBK}}} \times 100 \quad (\text{IV})$$

Es wurden jeweils die Mittelwerte aus den zum Vergleich herangezogenen, standardisierten Einzeltitern, die auf den entsprechenden Zellkulturen gemessen wurden, gebildet und in die Formeln eingesetzt.

Die resultierenden Prozentwerte wurden wie folgt interpretiert :

Das Testzellsystem (E.Derm. bzw. WISH) hat eine geringere Sensitivität als MDBK, wenn der Prozentwert aus Formel III bzw. IV größer ist als 0, und, analog dazu, eine höhere Sensitivität, wenn er kleiner ist als 0.

3.1.4. Neutralisation antiviraler Aktivität

Die Aufhebung der antiviralen Wirksamkeit der ZKÜ's mit einem polyklonalen Antiserum gegen humanes Interferon α und β (HuIFN- α , HuIFN- β) sollte die Beteiligung von Interferon an den gemessenen antiviralen Effekten und eine mögliche heterologe neutralisierende Potenz gegen xenogenes IFN beweisen.

Testzelle

Alle Neutralisationstests wurden auf MDBK-Zellkulturen (bis zur 10. Passage nach dem Auftauen) ausgeführt; Testzellkulturmedium war E-MEM (mit 2% FKS, 8 - 12 mM NaHCO_3 und Penicillin/Streptomycin-Zusatz).

Proben

Neben dem Versuch zur Neutralisation equiner und boviner ZKÜ's wurden, zur Kontrolle der neutralisierenden Potenz des verwendeten Antiserums im homologen System, der IFN-Labor-Standard und ein ZKÜ humaner PBML, die mit PIND-Orf β -PL/MOI 1 induziert wurden, überprüft.

Tabelle 13 enthält eine Übersicht der im Neutralisationstest untersuchten Zellkulturüberstände und deren VSV-antivirale Aktivität im unbehandelten und säurebehandelten (pH 2) Zustand, ausgedrückt in standardisierten Einheiten (I.U.) pro ml.

Tabelle 13 : Im Neutralisationstest untersuchte Proben mit bekannter VSV- antiviraler Aktivität (MDBK-Testsystem)

Probe	Induzent	MOI	antivirale Aktivität in I.U./ml	
			unbehandelt	pH 2-behandelt
Labor-Standard (rHuIFN- α)			155	155
ZKÜ's humPBML *	PIND-Orf B-PL	1	635	635
ZKÜ's equ.PBML	NDV	100	153	140
	EHV-1	0,5	72	48
	Parapox.ov	5	20	17
	PIND-Orf T	5	51	48
BEK-ZKÜ's	NDV	10	439	146
	EHV-1	0,5	782	60
	PIND-Orf T	10	32	11

(* Separation und Induktion der humanen PBML erfolgte analog der in 3.1.1. beschriebenen Methoden)

Antiserum

Schaf-Antiserum gegen natürliches humanes Leukozyten-Interferon- α und - β wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Kari Cantell, National Public Health Institute, Helsinki, zur Verfügung gestellt. Zur Immunisierung der Schafe wurde auf humanen peripheren mononukleären Blutleukozyten mit vermehrungsfähigem Sendai Virus induziertes Interferon benutzt (84).

Das überlassene Schaf- Antiserum besitzt eine Aktivität von 450.000 neutralisierenden Einheiten (n.U.)* / ml gegen HuIFN- α und 3.000 n.U./ml gegen HuIFN- β (Angaben von Prof. Cantell).

IFN-Antiserum-Verdünnungen wurden in 5-er Schritten ausgehend von 10^4 n.U./ml bis zu 5 n.U./ml (Anti-HuIFN- α) hergestellt.

Das konzentrierte Schaf- Antiserum und die Antiserum-Verdünnungen lagerten im Kühlschrank bei +4°C bis zur weiteren Verwendung.

* 1 neutralisierende Einheit (n.U.) /ml $\hat{=}$ Antikörperverschüttung, die 1 I.U./ml an antiviraler Aktivität neutralisiert (90)

3.1.4.1. Testdurchführung

Inkubation antiviral wirksamer ZKÜ's mit Anti-IFN-Serum auf MDBK-Zellkulturen

Im Rahmen eines Vorversuches zur Abklärung der Wirksamkeit des Anti-HuIFN-Serums wurden folgende pH 2-behandelte, antiviral wirksame Proben auf 640 E.U./ml eingestellt:

ZKÜ prä-induzierter equ.PBML, induziert mit NDV MOI 10,

ZKÜ NDV-induzierter (MOI 1) prim.BEK,

ZKÜ PIND-Orf β -PL-induzierter (MOI 1) humaner PBML und rHuIFN- α (Labor-Standard).

Sie wurden in 2-er Potenzen in vertikaler Richtung in einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) verdünnt und der Einwirkung verschiedener Konzentrationen des Antiserums (1000 n.U./ml bis 5 n.U./ml; in horizontaler Richtung verdünnt) ausgesetzt ("Schachbrett"-Titration) (50).

Eine verbliebene antivirale Wirksamkeit wurde gegen die übliche VSV-Belastungsverdünnung auf MDBK ausgetestet.

Mit allen anderen Proben wurde wie folgt verfahren:

In einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Fa. Nunc) wurden ab Lochreihe B jeweils 50 µl des Testzellkulturmediums vorgelegt.

Nachdem in die Vertiefungen 1 bis 7 der Reihe A jeweils 100 µl eines Zellkulturüberstandes (ZKÜ) einpipettiert wurden, konnte durch Überheben von je 50 µl mit der 12-Kanal-Pipette (Fa. Dynatech) in die folgenden Vertiefungsreihen eine 2-er Verdünnungsreihe hergestellt werden. Die erzielten Verdünnungsverhältnisse umfaßten somit den Bereich "unverdünnt" (in Lochreihe A) bis 1 : 128 (in Lochreihe H). Sämtliche getesteten Zellkulturüberstände wurden vor dem Versuch pH 2-behandelt und damit auf ihren säurestabilen Anteil der antiviralen Aktivität untersucht.

Jeder der vertikalen Vertiefungsreihen 1 bis 7 wurde eine der vorbereiteten Antiserum-Verdünnungen (10 n.U./ml bis 10.000 n.U./ml) zugeordnet und jeweils 50 µl der entsprechenden Verdünnung in die Vertiefungen A bis H der zugehörigen Spalten einpipettiert.

Nachdem die Testplatte ca. 1 min. auf den Mikrotiterplatten-Schüttler zur gründlichen Durchmischung der Reagenten verbracht wurde, erfolgte die Zugabe von 50 µl der mit Testzellkulturmedium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellten MDBK-Zellsuspension pro Vertiefung. Nach erneuter Durchmischung auf dem Mikrotiterplatten-Schüttler wurde die Testplatte, mit selbstklebender, steriler Plastikfolie versiegelt und für 24 Std. bei 37° C im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Die Kontrollen in den Tests zur Neutralisation antiviraler Wirksamkeit mit dem Schaf-Anti-IFN-Serum sind nachfolgend aufgelistet:

1. ZKÜ ohne Antiserum	50 µl ZKÜ entspr. der Verdünnungsreihe
2. Antiserum(As)-Kontrolle	50 µl Antiserum 10.000 n.U./ml
3. Normalserum-Kontrolle	50 µl Schaf-Normalserum*
4. Labor-Standard	50 µl des IFN-Labor-Standarts entspr. d. Verdünnungsreihe
5. VSV-Kontrolle	-
6. MDBK-Zellkontrolle	-

* wurde im gleichen Verhältnis mit Testzellkulturmedium verdünnt, wie das Stamm-Antiserum für die Antiserum(As)-Kontrolle

Virus-Belastung, Fixierung und Färbung

Als Virus-Belastungsverdünnung wurde, wie in den Tests zum Nachweis antiviraler Aktivität, eine VSV-Verdünnung eingesetzt, die nach 24 Stunden gerade noch 100 % lytischen cpE verursacht.

Das IFN-Antiserum und das Kontroll-Serum wurden vor der Virusbelastung auf eventuell zytotoxische Effekte für MDBK-Zellen mikroskopisch kontrolliert.

Fixierung und Färbung des Zellrasens erfolgte 24 Std. nach Abschluß der Virus-Belastung nach dem vorher beschriebenen Verfahren.

3.1.4.2. Testauswertung

Die Reduktion des zytopathischen Effektes des VSV-Belastungsvirus auf der Testzellkultur um 50 % wird, laut Definition, durch eine Einheit IFN (1 Unit) pro Zellkulturvertiefung vermittelt (84).

Das prozentuale Verhältnis der antiviralen Titer in E.U.* pro ml (AV) des mit Antiserum inkubierten ZKÜ zu dem ohne Antiserum getesteten ZKÜ errechnet sich wie folgt (Formel V):

$$AV (\%) = \frac{E.U./ml \text{ (vorbehandelt mit Antiserum mit } x \text{ n.U./ml)}}{E.U./ml \text{ (ohne Vorbehandlung mit Antiserum)}} \times 100$$

(V)

*

E.U. = experimental Units; unkorrigierte, im jeweils aktuellen
Test abgelesene Einheiten VSV-antiviraler Aktivität (49)

3.1.5. Überprüfung des Einflusses der Behandlung von Zellkulturen mit antiviral wirksamen Überständen auf die Vermehrung von equinem Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) und bovinem Herpesvirus Typ 1 (BHV-1)

Grundlage dieses Versuchs ist die Hemmung der Virusvermehrung auf Zellkulturen nach Vorbehandlung mit Zellkulturüberständen, die eine definierte antivirale Aktivität besitzen (43,68,121).

Die Menge infektiöser Viruspartikel wird durch Titration zellfreier Überstände der mit antiviral wirksamen ZKÜ's vorbehandelten (und vergleichend dazu unbehandelten) Herpesvirus-beimpften Zellkulturen bestimmt (68,123).

3.1.5.1. Messung der Herpesvirusvermehrung in homologen Zellkulturen, die mit antiviral wirksamen Zellkulturüberständen vorbehandelt wurden

Virusmaterial

Als Testvirus wurde equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1), Stamm Rac-H (Bezeichnung der verwendeten Passage : 263. ENS, 13. RK₁₃, 3. E. Derm.) benutzt. Das konzentrierte Virusmaterial besaß eine mittlere kulturinfektiöse Dosis von $10^{8,5} \text{KID}_{50} / \text{ml}$. Zur EHV-1-Vermehrung wurde die E.Derm.-Zelllinie benutzt.

Bovines Herpesvirus Typ 1 (BHV-1), Stamm Los Angeles, stand in folgenden Passagen zur Verfügung :

36. BEK, 8. BEL , $10^{8,75} \text{KID}_{50} / \text{ml}$;

35. BEK, 8. BEL, 1. MDBK , $10^8 \text{KID}_{50} / \text{ml}$;

Zur BHV-1-Vermehrung wurden die MDBK-Zelllinie sowie sekundäre BEK-Zellen beimpft.

Zellkultureinsaat, Vorbehandlung mit antiviral wirksamen Zellkulturüberständen und Herpesvirusvermehrung

In 24-Loch-Zellkulturplatten (Microdish; Fa. Nunc) wurden pro Vertiefung je 1 ml der entsprechenden, auf $3,5 \times 10^5$ Zellen /ml eingestellten Zellsuspension mit je 1 ml der säurebehandelten, auf die antivirale Aktivität von 0,1, 1, bzw. 10 I.U./ml eingestellten Zellkulturüberstände vermischt und für 18 bis 24 Stunden bei 37° C im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde, nach Abgießen des Mediums der mittlerweile dicht gewachsenen Zellkultur, pro Vertiefung je 1 ml der auf eine MOI von 1 eingestellten Herpesvirussuspension zugegeben. Die beimpfte Zellkultur wurde zur Virusadsorption für eine Stunde im CO_2 -Brutschrank bebrütet, das Virusinokulum anschließend dekantiert, der Zellrasen vorsichtig mit warmer PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) nachgespült, und je 1 ml Zellkulturmedium für die weitere 24-stündige Inkubation einpipettiert.

Die Virusernte erfolgte durch Abhebern der Zellkulturüberstände. Diese wurden für 10 min. bei $350 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert und bis zur Titerbestimmung bei -70° C gelagert.

Kontrollen

Folgende Kontrollen wurden zu jedem Versuchsansatz angelegt :

Zellkontrolle:

Inkubation der entsprechenden Zellkultur nur mit Zellkulturmedium in entsprechenden Volumina.

ZKÜ-Kontrolle:

Vorbehandlung des Zellrasens mit entsprechendem Zellkulturüberstand (ZKÜ), ohne anschließende Virusbelastung.

Induzenten-Kontrolle:

Alleinige Behandlung der Zellkultur mit dem Induzenten in der im entsprechenden ZKÜ enthaltenen Konzentration, anschließend Herpesvirusbelastung.

Herpesvirusvermehrungs-Kontrolle:

keine Vorbehandlung der entsprechenden Zellkulturen.

Jeweils 0,1 ml der Überstände der Kontroll-Kulturen wurden vor der Herpesvirustitration auf VSV-antivirale Aktivität untersucht

Nach Ernte und Zentrifugation (siehe oben) wurden die Kontroll-ZKÜ's bis zur Titrierung bei -70° C gelagert.

Herpesvirus-Titration in der 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte

Die oben beschriebenen Virusernten wurden auf dem selben Zellsystem autitriert, auf dem sie produziert wurden.

Die Titrationsmethode entspricht im Wesentlichen der in 3.1.1. beschriebenen, wobei die Virusverdünnung in 4-er Schritten und die Virus-inokulierung simultan mit der Testzell-Einsaat erfolgten.

3.1.5.2. Testauswertung

Die Entwicklung des zytopathischen Effektes (cpE) wurde täglich im Umkehrmikroskop bei 400-facher Vergrößerung kontrolliert und protokolliert. Die Endablesung fand 72 Stunden post infectionem statt.

Die Titerbestimmung erfolgte mit der Methode nach Spearman und Kaerber (77), die Angabe der Virusinfektiosität als mittlere kultur-infektiöse Dosis KID_{50}/ml .

Um den prozentualen Unterschied (VR) der KID_{50}/ml von Herpesvirus, das auf Zellen, die mit antiviral (VSV) wirksamen ZKÜ's behandelt waren, inokuliert wurde, verglichen zur Virusvermehrung in unbehandelten Zellkulturen aufzuzeigen, wurde folgende Formel (VI) verwendet:

VR (%) =

$$\frac{KID_{50}/ml \text{ (nach Vorbehandlung mit } x \text{ I.U./ml antiviraler Aktivität)}}{KID_{50}/ml \text{ (Virusvermehrungs-Kontrolle)}} \times 100$$

(VI)

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Nachweis der antiviralen Aktivität im Überstand induzierter Zellkulturen

Mit allen verwendeten Testzelllinien ließ sich eine antivirale Aktivität gegen VSV reproduzierbar nachweisen.

Die Zellkontrollen jedes zur Auswertung benutzten Testansatzes bildeten 24 Stunden nach der Einsaat in die Mikrotiterplatte dichte, intakte Monolayer aus, die sich bis zur Fixierung nicht veränderten. In den Viruskontrollen verursachte die entsprechende VSV-Belastungsverdünnung bis zum Zeitpunkt der Testfixierung immer eine vollständige Lysis der Zellrasen. Die Kontrolltitrationen der VSV-Belastungsverdünnung ergaben keine Hinweise auf Schwankungen in der Infektionsstärke der Virussuspension.

In den Überständen der mit 600 E.U./ml E.coli-Standard-Lipopolysaccharid behandelten equ.PBML- und prim. BEK-Kulturen war keine VSV-antivirale Aktivität nachweisbar.

Die Höhe der experimentellen Titer des Labor-Standards (rHuIFN- α) verhielt sich auf den einzelnen Testzellen wie folgt:

Tabelle 14 : Mittlere antivirale (VSV) Aktivität des IFN-Labor-Standards in MDBK-, E.Derm.- und WISH-Testzellen

Testzelle	Mittelwert der Titer des IFN-Laborstandards (rHuIFN- α ; 200 I.U./ml) in E.U./ml	Standard- abweichung ($\pm$ E.U./ml)	Anzahl der Tests
MDBK	674	341	28
E.Derm.	284	220	28
WISH	457	171	7

MDBK-Testzellen waren im Vergleich zu E.Derm.- und WISH-Zellen am sensitivsten gegenüber der definierten antiviralen (VSV) Wirksamkeit von rekombinantem HuIFN- α .

Auf den Zellrasen der Induzenten-Kontroll-Vertiefungen wirkte die VSV-Belastungsverdünnung stets lytisch.

Die im folgenden Kapitel 3.2.1. beschriebenen antiviralen (VSV) Aktivitäten beziehen sich auf das MDBK-Testsystem. Der Gehalt an antiviraler Aktivität jedes ZKÜ's ist der Mittelwert aus den Ergebnissen zweier zeitlich voneinander unabhängigen Tests. Wurden Zellkulturen von mehr als einem Spendertier der gleichen Induktion unterworfen, so wurden die einzelnen Gehalte an antiviraler Aktivität entsprechend der Anzahl der Spender gemittelt.

3.2.1.1. Kinetik antiviraler Aktivität gegen Stomatitis vesicularis Virus (VSV) im Überstand induzierter equ.PBML-Kulturen

Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität nach Induktion mit attenuierten Viren

Mit Ausnahme des Avipoxvirus und des Parapoxvirus in der Induktionsdosis MOI 0,1 konnten die geprüften Virusspezies equ.PBML zur Produktion und Elution antiviral wirksamer Substanzen stimulieren.

Tabelle 15 gibt einen Überblick der Induktionsversuche equiner PBML mit attenuierten Viren :

Tabelle 15 : Mittelwerte der antiviralen Aktivitäten (I.U./ml) der Induktionsversuche equiner PBML mit attenuierten Viren

Induzent	MOI	Titer VSV-antiviraler Aktivität in I.U./ml			Zahl der induzierten equ.PBML-Kulturen (versch.Spendertiere)
		24h	48h	72h	
NDV	1	11 (4) ⁺	12 (5)	17 (1)	3
NDV	5	14 (1)	12 (4)	15 (1)	3
NDV	10	18 (9)	25 (21)	14 (10)	3
NDV	100	159 (140)	107 (96)	81 (61)	6
EHV-1	0,5	54 (2)	45 (10)	33 (3)	3
EHV-1	1	48 (21)	61 (17)	60 (22)	3
Parapox.ov.	0,1	0	0	0	3
Parapox.ov.	1	20 (9)	17 (8)	18 (10)	3
Parapox.ov.	5	45 (34)	42 (20)	26 (10)	3

(* Standardabweichung der Titer in ZKÜ's equ.PBML unterschiedlicher Spendertiere)

Sowohl die Höhe der gemessenen Aktivitäten, als auch der Zeitpunkt des höchsten VSV- antiviral wirksamen Titors, variierten entsprechend der zur Induktion der Zellkultur benützten Virusart und ihrer MOI.

Bereits 24 Stunden post inductionem wurden die jeweils höchsten Werte in den Überständen der wie folgt induzierten Zellkulturen gemessen: NDV/MOI 100 (159 I.U./ml),

EHV-1/MOI 0,5 (54 I.U./ml),

Parapoxvirus ovis /MOI 1 und 5 (jeweils 45 I.U./ml).

Die antivirale Aktivität der ZKÜ's der mit EHV-1 in einer MOI 1 und mit NDV in einer MOI 10 induzierten Kulturen erreichte 48 Stunden p.induct. die höchsten Werte (61 I.U./ml bzw. 21 I.U./ml), die der mit NDV in MOI's von 1 und 5 induzierten Zellkulturen erst nach 72 Stunden (17 I.U./ml bzw. 15 I.U./ml).

ZKÜ's von NDV-induzierten Kulturen in den MOI's 1 bis 10 zeigten, ähnlich wie mit Parapoxvirus-induzierte Kulturen in der MOI 1, Titer-schwankungen, die innerhalb von 72 Stunden p.induct. nur zwischen 3 I.U./ml (NDV MOI 5, Parapox MOI 1) und 6 I.U./ml (NDV MOI 5) betrugen.

Besonders auffällig waren dagegen die hohen Standardabweichungen der mit NDV/MOI 100 produzierten antiviralen Aktivitäten. Diese Ungenauigkeit könnte durch die unterschiedliche Sensitivität der PBML einzelner Probanden gegenüber der hohen Induzentendosis bzw. durch nicht verifizierbare Einflüsse auf das Testzellsystem zurückzuführen sein.

Abb. 2: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität NDV-induzierter equ.PBML

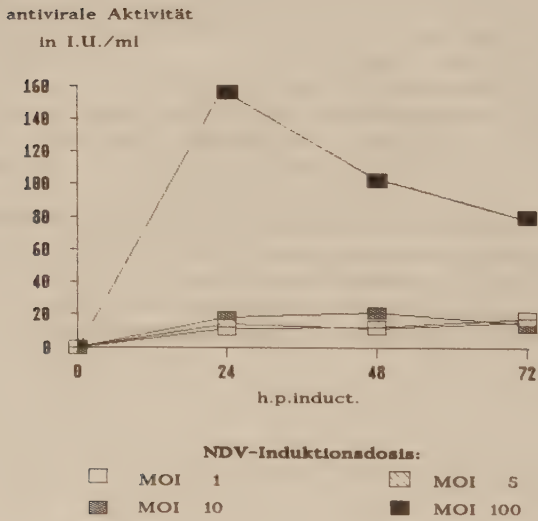


Abb. 3 : Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität EHV-1-induzierter equ.PBML

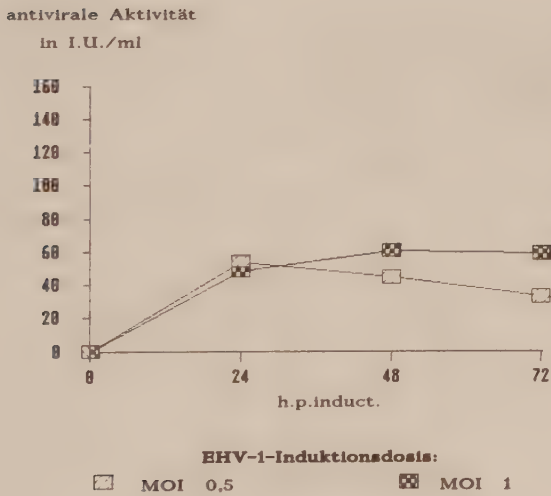
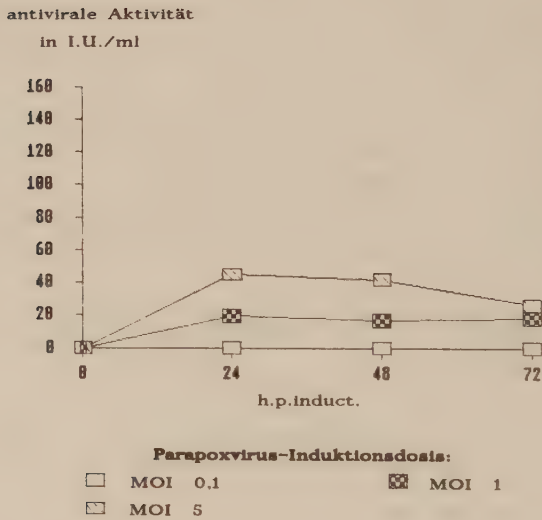


Abb. 4: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität Parapoxvirus ovis-induzierter equ.PBML



Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität nach Induktion equiner PBML mit Paramunitätsinducern

Tabelle 16 enthält eine Übersicht der Induktionsversuche equ.PBML mit Paramunitätsinducern:

Tabelle 16 : Mittelwerte der antiviralen Aktivitäten (I.U./ml) der Induktionsversuche equ.PBML-Kulturen mit Paramunitäts-inducern

Induzent	MOI	Titer			Zahl der induzierten equ.PBML-Kulturen (versch.Spendertiere
		VSV-antiviraler			
		Aktivität			
		in I.U./ml			
		24h	48h	72h	
p.induct.					
PIND-Orf 047 T	0,1	0 (0) ⁺	6 (1)	0 (0)	3
	0,5	5	5	0	1
	1	5 (0)	7 (2)	7 (2)	3
	5	13 (4)	25 (17)	31 (15)	3
PIND-Orf B-PL	0,1	8	0	0	1
	0,5	6	8	6	1
	1	13 (7)	16 (7)	16 (7)	2
	5	31	31	20	1
PIND-Avi 196	0,1	0	0	0	1
	0,5	0	0	0	1
	1	14	12	14	1
	5	13	14	14	1

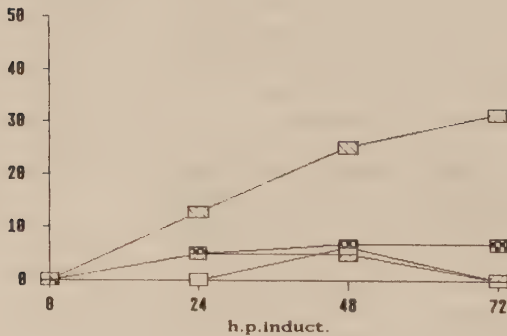
(⁺ Standardabweichung der Titer von ZKÜ's equ.PBML unterschiedlicher Spendertiere)

Die eingesetzten Paramunitätsinducer bewirkten in equinen PBML-Kulturen eine Produktion extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirksamer Substanzen. Der Induzent PIND-Avi konnte nur in den Konzentrationen MOI 1 und 5 eine meßbare antivirale (VSV) Aktivität anregen.

Während sich die Höhe der erreichten antiviralen Titer der ZKÜ's nach Induktion mit PIND-Orf T und PIND-Orf B-PL (jeweils in der MOI 5; 31 I.U./ml) nicht unterschied, konnte bei PIND-Orf B-PL-induzierten Kulturen die höchste Aktivität bereits 24 Stunden p.induct. und noch 48 Stunden p.induct., bei PIND-Orf T-induzierten Kulturen jedoch erst 72 Stunden p.induct. im Überstand nachgewiesen werden.

Abb. 5: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität PIND-Orf T-induzierter equ.PBML

antivirale Aktivität
in I.U./ml



□ MOI 0,1
▣ MOI 1

▤ MOI 0,5
◻ MOI 5

Abb. 6: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität PIND-Orf β -PL-induzierter equ.PBML

antivirale Aktivität
in I.U./ml

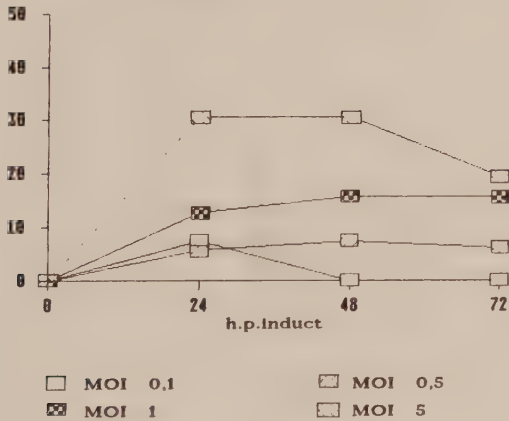
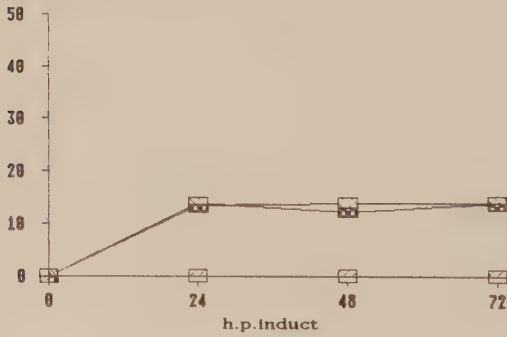


Abb. 7: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität PIND-Avi-induzierter equ.PBML

antivirale Aktivität
in I.U./ml



□ MOI 0,1

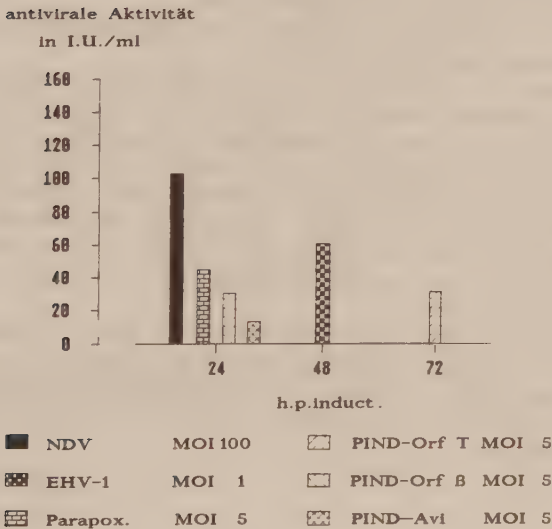
▣ MOI 1

▤ MOI 0,5

▥ MOI 5

Abbildung 8 enthält eine vergleichende Darstellung (höchste Werte) der durch die Einwirkung der Virusinduzenten produzierten VSV-antiviralen Aktivität in ZKÜ's equiner PBML-Kulturen :

Abb. 8: Antivirale (VSV) Aktivität in ZKÜ's induzierter equ.PBML Kulturen (Höchstwerte)



3.2.1.2. Kinetik der im Überstand induzierter primärer BEK-Organzellkulturen nachweisbaren VSV-antiviralen Aktivität

Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität nach Induktion mit vermehrungsfähigen, attenuierten Viren

Primäre bovine fetale Nierenzellkulturen waren nur durch NDV und EHV-1 zur Produktion antiviraler Aktivität zu stimulieren, während unbehandeltes, voll vermehrungsfähiges Parapoxvirus ovis und Avipoxvirus gallinae keine meßbaren antiviralen Aktivitäten induzieren konnten. In Parapoxvirus-beimpften primären BEK-Monolayern entwickelten sich während der Inkubationszeit lytische Herde.

Tabelle 17 enthält einen Überblick der Induktionsversuche primärer BEK-Kulturen mit attenuierten Viren.

Die Gehalte an antiviraler Aktivität von ZKÜ's EHV-1-induzierter BEK-Kulturen ergaben ungewöhnlich hohe Werte. Es war kein Zusammenhang der Titerhöhe mit dem Reifezustand der Rinderfeten erkennbar.

Ein Einfluß der Höhe der eingesetzten MOI von NDV auf die Höhe und Kinetik der gemessenen antiviralen Aktivität war erkennbar. Mit MOI 0,1 und 1 induzierte BEK-Zellen produzierten hohe antivirale Titer 48 Stunden p.induct. Die mit den höheren MOI's 10, 50 und 100 induzierten Kulturen produzierten die höchsten Titer schon 24 Stunden p.induct. (siehe Abb. 9).

Bei EHV-1-induzierten BEK-Kulturen konnte bis zur Induktionsdosis MOI 5 kein Einfluß der Induzenten-MOI auf die Höhe der erzeugten antiviralen Aktivität festgestellt werden. Die höchsten Aktivitäten wurden bei allen untersuchten MOI's 48 Stunden p.induct. beobachtet. (siehe Abb. 10)

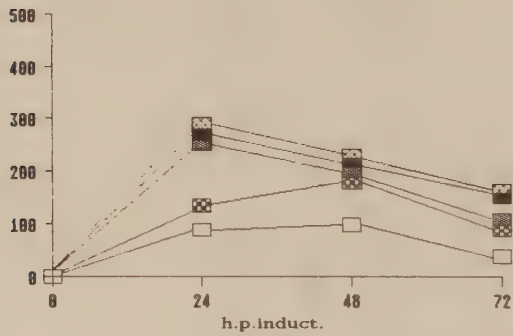
Tabelle 17 : Mittelwerte der antiviralen Aktivitäten (I.U./ml) der Induktionsversuche prim. BEK-Kulturen mit attenuierten Viren

Induzent	MOI	Titer			Zahl der induzierten prim.BEK-Kulturen (versch.Rinderfeten)
		VSV-antiviraler			
		Aktivität			
		(in I.U./ml)			
		24h	48h	72 h	
p.induct					
NDV	0,1	88 (6) +	96 (44)	52 (10)	3
	1	132 (13)	189 (47)	97 (17)	3
	10	273 (61)	224 (23)	128 (20)	3
	50	298 (30)	194 (28)	150 (40)	3
	100	269	178	137	2
	EHV-1	0,1	262	367	354
0,5		425	436	298	2
1		349	349	326	1
5		402	433	312	2
10		561	582	348	2

(* Standardabweichung der antiviralen Aktivität der ZKU's primärer BEK-Kulturen verschiedener Rinderfeten)

Abb. 9: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität NDV-induzierter primärer BEK-Zellkulturen

antivirale Aktivität
in I.U./ml



□ MOI 0,1

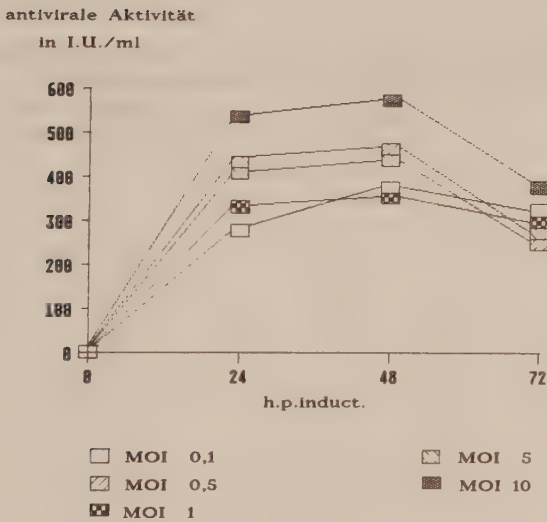
▣ MOI 1

▤ MOI 10

▥ MOI 50

■ MOI 100

Abb. 10: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität EHV-1-induzierter primärer BEK-Zellkulturen



Im Vergleich zur Titerhöhe der ZKÜ's analog mit diesen beiden Virus-spezies induzierter equ.PBML- Kulturen waren die in BEK-ZKÜ's gemessenen antiviralen Aktivitäten ca. um das 3- (NDV MOI 100) bis 10-fache (EHV MOI 0,1) höher.

Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität nach Induktion mit Paramunitätsinducern

Tabelle 18 enthält einen Überblick der Induktionsversuche primärer BEK-Kulturen mit Paramunitätsinducern.

Tabelle 18 : Mittelwerte der antiviralen Aktivitäten (I.U./ml) der Induktionsversuche prim. BEK-Kulturen mit Paramunitätsinducern

Induzent	MOI	Titer			Zahl der induzierten prim.BEK-Kulturen versch.Rinderfeten)
		VSV-antiviraler			
		Aktivität			
		(in I.U./ml)			
		24h	48h	72 h	
p.Induct					
PIND-Orf 047T	0,1	0	14	0	1
	0,5	0	21	0	1
	1	14	17	1	2
	5	20 *	16	9	2
	10	37	20	17	2
PIND-Orf 8-PL	0,1	0	0	0	1
	0,5	0	0	0	1
	1	0	10	0	1
	5	0	12	0	1

Die Paramunitätsinducer PIND-Orf T (in allen untersuchten MOI's) und PIND-Orf 8-PL (in den MOI's 1 und 5) konnten BEK-Zellen zur Produktion antiviraler Substanzen stimulieren.

In Überständen der PIND-Orf β -PL (MOI 0,1 und 0,5)-induzierten BEK-Kulturen waren keine antiviralen Aktivitäten meßbar. Mit Erhöhung der eingesetzten MOI war ein Anstieg der antiviralen Aktivität in den ZKÜ's (PIND-Orf T und PIND-Orf β -PL) nachzuweisen. Der Zeitpunkt, zu dem die höchste antivirale Aktivität im Überstand gefunden wurde, war für PIND-Orf T beim Einsatz einer MOI > 1 24 Stunden früher, als bei einer MOI ≤ 1 .

Abb. 11a: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität PIND-Orf T-induzierter, primärer BEK-Zellkulturen (MOI 0,1 bis 1)

antivirale Aktivität
in I.U./ml

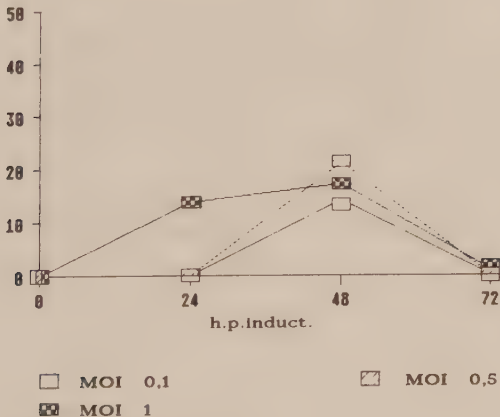


Abb. 11b: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität PIND-Orf T-induzierter, primärer BEK-Zellkulturen (MOI 5 und 10)

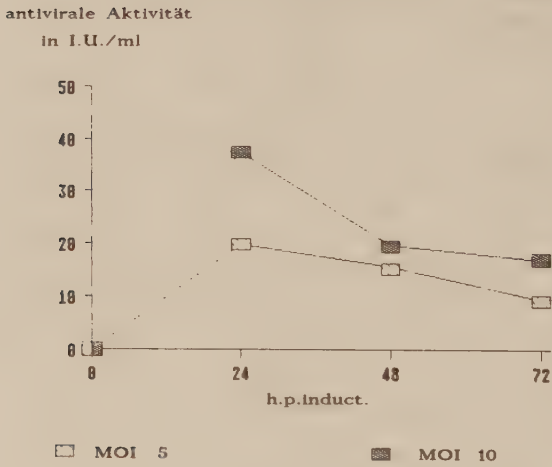
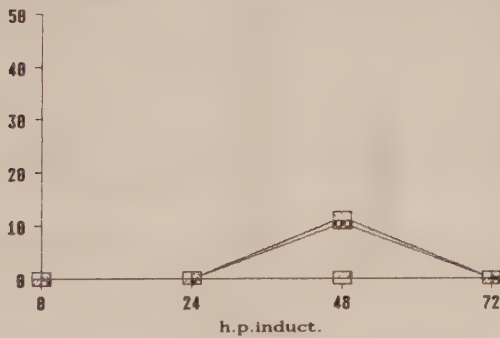


Abb. 12: Kinetik der Produktion antiviraler Aktivität PIND-Orf β -PL-induzierter, primärer BEK-Zellkulturen

antivirale Aktivität
in I.U./ml



□ MOI 0,1

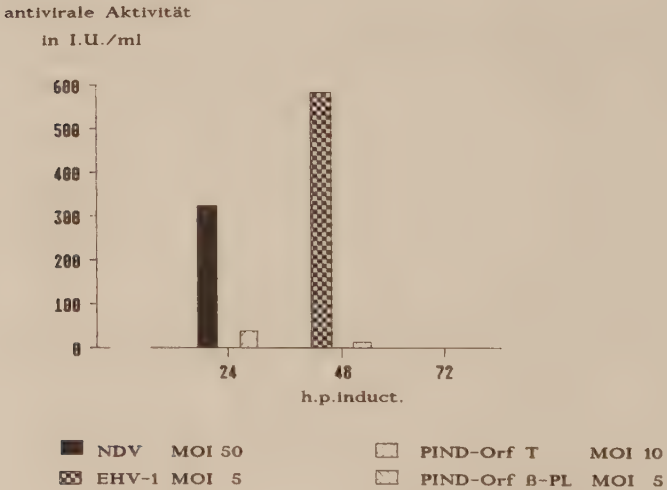
▤ MOI 0,5

▣ MOI 1

▢ MOI 5

Abbildung 13 enthält eine vergleichende Darstellung der von den einzelnen Induzenten erzeugten, höchsten antiviralen Aktivitäten gegen VSV in ZKÜ's primärer BEK-Zellkulturen:

Abb. 13: Höchste antivirale (VSV) Aktivität in ZKÜ's primärer BEK-Kulturen



3.2.1.3. Einfluß der Prä-Induktion ("Priming") von equ.PBML-Kulturen auf die Höhe der im Überstand nachweisbaren antiviralen Aktivität

Die relativ niedrigen antiviralen Aktivitäten, die nach alleiniger NDV-Induktion equiner PBML gemessen wurden, waren der Anlaß, eine Erhöhung der Produktion extrazellulär nachweisbarer, antiviral wirksamer Substanzen durch Prä-Induktion und nachfolgende Induktion equ. PBML-Kulturen zu bewirken.

Prä-Induktion mit attenuierten, vermehrungsfähigen Viren

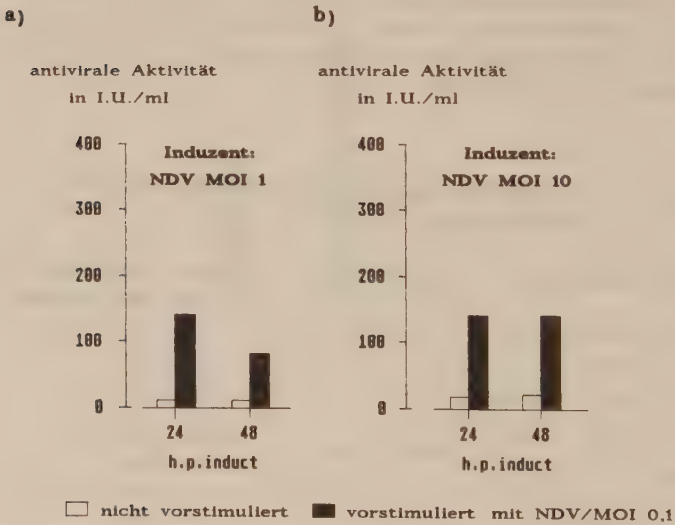
Eine Zusammenfassung der zur Prä-Induktion verwendeten Viren, sowie des zur nachfolgenden Induktion vorstimulierter equ.PBML benutzten Virusmaterials (Meßwerte der antiviralen Aktivität 24 und 48 Stunden p.induct.) enthält Tabelle 19 :

Tabelle 19 : "Priming" und Induktion equ.PBML mit attenuierten, vermehrungsfähigen Viren

Prä-Induzent	MOI		Induzent	MOI	antivirale Aktivität in I.U./ml		
					24 h	48 h	p.induct.
NDV	ohne	}	NDV	1	11	12	
	0,1				141	81	
NDV	ohne	}	NDV	10	18	21	
	0,1				141	141	
Parapox.ov.	ohne	}	Parapox.ov.10		45	45	
	0,1				47	47	

Mit NDV-vorstimulierte (MOI 0,1) equ.PBML produzierten 24 Stunden p.induct. eine ca. 7- (nach Induktion mit NDV/MOI 10) bis 13-fach (nach Induktion mit NDV/MOI 1) höhere antivirale Aktivität als nicht vorbehandelte, jedoch analog induzierte equ.PBML. Die Aktivität der ZKÜ's vorstimulierter, mit NDV/ MOI 1-induzierten Kulturen nahm nach 48 Stunden um etwa 40 % ab, während sich die Aktivität der ZKÜ's vorstimulierter, mit NDV/MOI 10-induzierten Kulturen zum gleichen Zeitpunkt nicht verringerte (siehe Abb. 14a und 14b).

Abb. 14 : Antivirale Aktivität in ZKÜ's vorstimulierter(NDV/MOI 0,1), NDV-induzierter (a) MOI 1 ; b) MOI 10) equiner PBML



Die Prä-Induktion mit Parapoxvirus ovis (MOI 0,1) hatte keinen steigenden Effekt auf die antivirale Aktivität im ZKÜ Parapoxvirus-induzierter (MOI 10) equiner PBML.

Prä-Induktion mit definierter antiviraler Aktivität (ZKÜ's NDV-induzierter equ.PBML)

Tabelle 20 faßt die eingesetzte definierte antivirale Aktivität in I.U. pro ml der vorzustimulierenden Zellsuspension und die MOI's der verwendeten viralen Induzenten zusammen. (Antivirale Titer 24 und 48 Stunden p.induct. und pH 2-stabiler Anteil) :

Tabelle 20 : Prä-Induktion mit definierter antiviraler Aktivität und NDV-Induktion equiner PBML

Prä-Induzent :	Induzent :	antivirale Aktivität in I.U./ml :	
equ.PBML-ZKÜ (I.U./ml behandelter Zellsuspension)	NDV / MOI	24h 48h p.induct.	
ohne	}	18 21	
0,5 I. U./ml		141 117 [117] ⁺	
ohne	}	18 21	
1 I.U./ml		141 81	
ohne	}	103 85	
1 I.U./ml		[91]	
		316	n.u. ++
		[310]	

(⁺ [in Klammern]: pH 2-stabiler Anteil in I.U./ml;

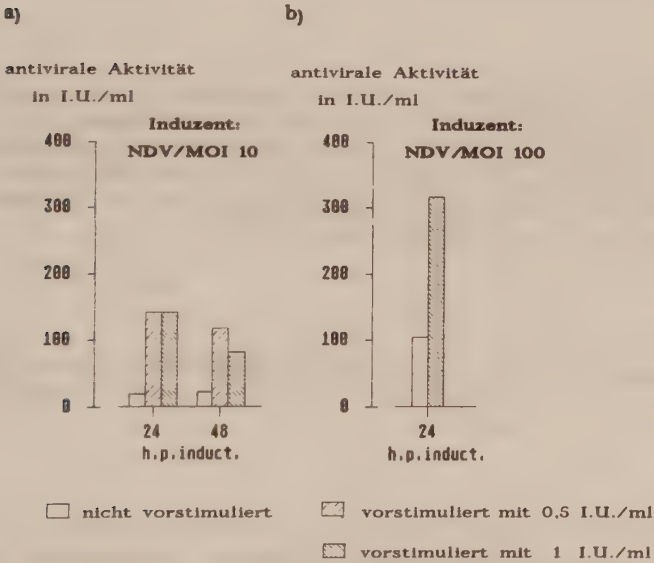
⁺⁺ n.u. = nicht untersucht)

Die Vorstimulation ("Priming") equiner PBML-Kulturen mit ZKÜ's definierter antiviraler Aktivität (0,5 bzw. 1 I.U. pro ml PBML-Zellsuspension) aus homologen, NDV-induzierten equ.PBML-Kulturen, erhöhte die gemessene antivirale Aktivität nach NDV-Induktion um das 3- bis 7-fache verglichen zu analoger Induktion nicht vorstimulierter equ.PBML.

Bei equ.PBML, die mit 0,5 I.U./ml oder 1 I.U./ml antiviral wirksamen, allogenen ZKÜ's vorstimuliert und mit NDV/MOI 10 induziert waren, wurden 24 Stunden p.induct. gleiche antivirale Aktivitäten im Überstand nachgewiesen. Lediglich 48 Stunden p.induct. waren in ZKÜ's der mit 1 I.U./ml vorstimulierten Kulturen geringere Aktivitäten, als in ZKÜ's der mit 0,5 I.U./ml vorstimulierten (81 I.U./ml bzw. 117 I.U./ml) nachzuweisen.

Die pH 2-Behandlung einiger ZKÜ's zeigte, daß die erzeugte antivirale Aktivität zum größten Teil säurestabil war.

Abb. 15 : Antivirale Aktivität in ZKÜ's vorstimulierter (0,5 und 1 I.U. pro ml behandelter Zellsuspension), NDV-induzierter (a) MOI 10 ; b) MOI 100) equiner PBML



Um die antivirale Wirksamkeit auf homologen und heterologen Zellen abzuklären, wurden auf MDBK-Zellen VSV-antiviral wirksame ZKÜ's equiner und boviner Herkunft (unbehandelt und pH 2-behandelt) im E.Derm.- und WISH-Testsystem ebenfalls gegen eine VSV-Belastung untersucht.

3.2.2. Sensitivitätsunterschiede der Testzellen E.Derm. und WISH im Vergleich zu MDBK beim Nachweis VSV-antiviraler Aktivität in ZKÜ's induzierter equ.PBML- und BEK-Zellkulturen

Die Tabellen 21 a und 21 b enthalten Zusammenstellungen der mittleren prozentualen Unterschiede antiviraler Aktivitäten gegen VSV in verschiedenen Testzellsystemen. Jeweils unbehandelte oder pH 2-behandelte ZKÜ's identisch induzierter equiner PBML- und BEK-Kulturen wurden auf E.Derm.- und WISH-Zellen getestet und die Ergebnisse mit den Resultaten auf MDBK-Testzellen verglichen :

Tabelle 21 a: Mittlere Sensitivität im Nachweis VSV-antiviraler Aktivität von MDBK-Testzellen gegenüber E.Derm.-Testzellen

Herkunft und Vorbehandlung der ZKÜ's	Mittl. Sensitivitätsunterschied von MDBK zu E.Derm. in % (nach Formel III)	Anzahl der geprüften Einzelproben
equ.PBML	+ 52	127
equ.PBML pH 2	+ 33	15
BEK	- 33	447
BEK pH 2	+ 21	9

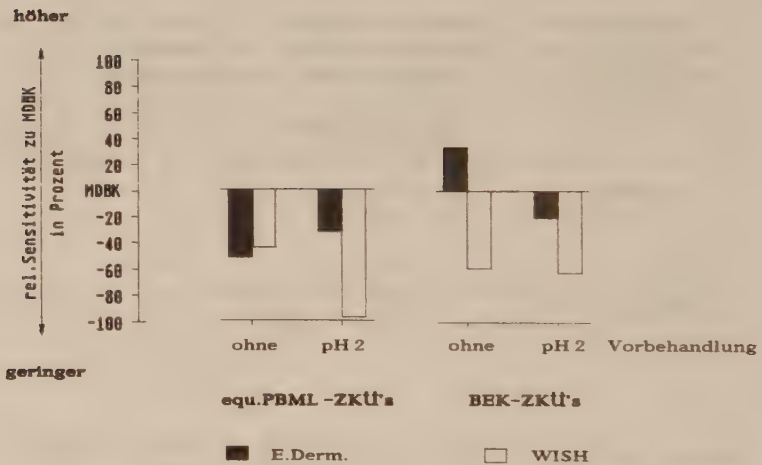
Tabelle 21 b: Mittlere Sensitivität im Nachweis VSV-antiviraler Aktivität von MDBK-Testzellen gegenüber WISH-Testzellen

Herkunft und Vorbehandlung der ZKt's	Mittl.Sensitivitätsunterschied von MDBK zu WISH in % (nach Formel IV)	Anzahl der geprüften Einzelproben
equ.PBML	+ 45	22
equ.PBML pH 2	+ 98	11
BEK	+ 59	8
BEK pH 2	+ 62	8

E.Derm. und WISH erwiesen sich insgesamt als weniger sensitiv im Nachweis VSV-antiviraler Aktivität im Vergleich zu MDBK.

Die E.Derm.-Zelllinie reagierte jedoch auf die antivirale Aktivität in bovinen Zellkulturüberständen um 33 % empfindlicher, als die MDBK-Zelllinie. Auffällig war die, im Vergleich zu MDBK, um 98 % niedrigere Empfindlichkeit von WISH-Zellen gegenüber den pH-stabilen Anteilen antiviraler Aktivität in Überständen equiner PBML.

Abb. 16: Sensitivitätsunterschiede der Testzellen E.Derm. und WISH gegenüber MDBK-Zellen beim Nachweis VSV-antiviraler Aktivität in unbehandelten und pH 2-behandelten ZKÜ's induzierter equiner und boviner Zellkulturüberstände



Zur näheren Charakterisierung der für die induzierte antivirale Aktivität verantwortlichen Substanzen wurde versucht, die nach der pH 2-Behandlung verbliebene VSV-antivirale Wirksamkeit in ZKÜ's equiner und boviner Zellkulturen durch Behandlung mit einem Antiserum gegen natürliches humanes Leukozyten-Interferon zu neutralisieren.

3.2.3. Neutralisation antiviraler Aktivität in ZKÜ's induzierter equ.PBML- und BEK-Zellkulturen durch ein polyklonales Antiserum vom Schaf gegen humanes Leukozyten-Interferon (Anti-HuIFN)

Im Rahmen der "Schachbrett"-Titration konnte die auf 640 E.U./ml eingestellte antivirale Wirksamkeit homologer und heterologer Proben durch Behandlung mit dem Anti-HuIFN- α /HuIFN- β -Serums vom Schaf ganz oder teilweise aufgehoben werden.

Das Antiserum neutralisierte die VSV-antivirale Aktivität des IFN-Labor-Standards (rHuIFN- α) und des ZKÜ PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML bereits mit 10 HuIFN- α -neutralisierenden Einheiten (n.U.)/ml vollständig.

Erst mit 500 n.U./ml konnte die antivirale Aktivität des equinen ZKÜ aufgehoben werden.

Die Antiserum-Konzentration 1000 n.U./ml gegen HuIFN- α bewirkte eine Reduktion der antiviralen Wirksamkeit des bovinen ZKÜ von 640 E.U./ml auf 240 E.U./ml.

Die Abbildungen 17 a bis c zeigen die zur Auswertung angefärbten Testansätze der "Schachbrett"-Titration :

Abb. 17 a: "Schachbrett"-Neutralisation der antiviralen Wirksamkeit eines rekombinanten HuIFN- α (Labor-Standard) mit Anti-HuIFN-Serum vom Schaf

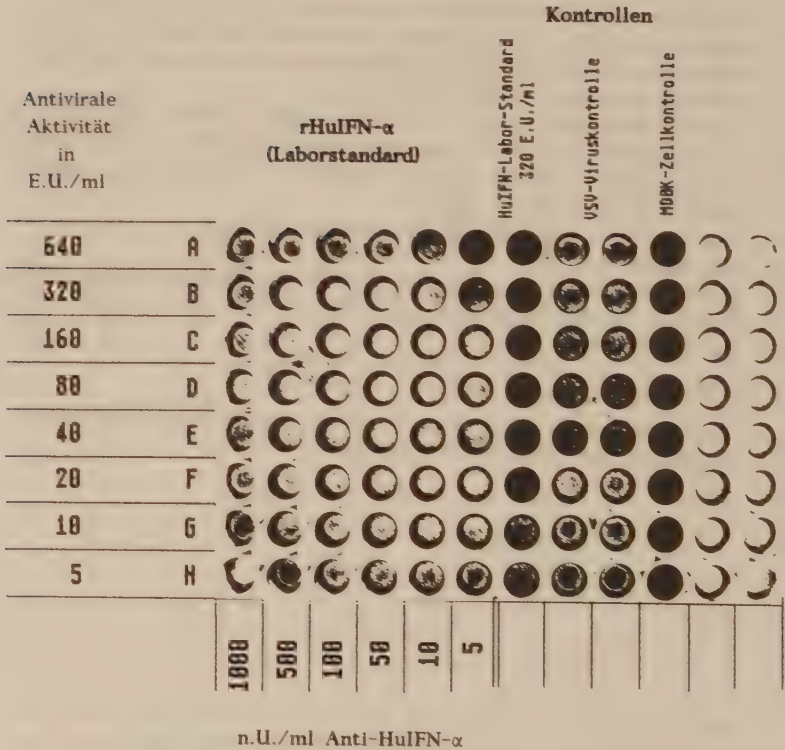
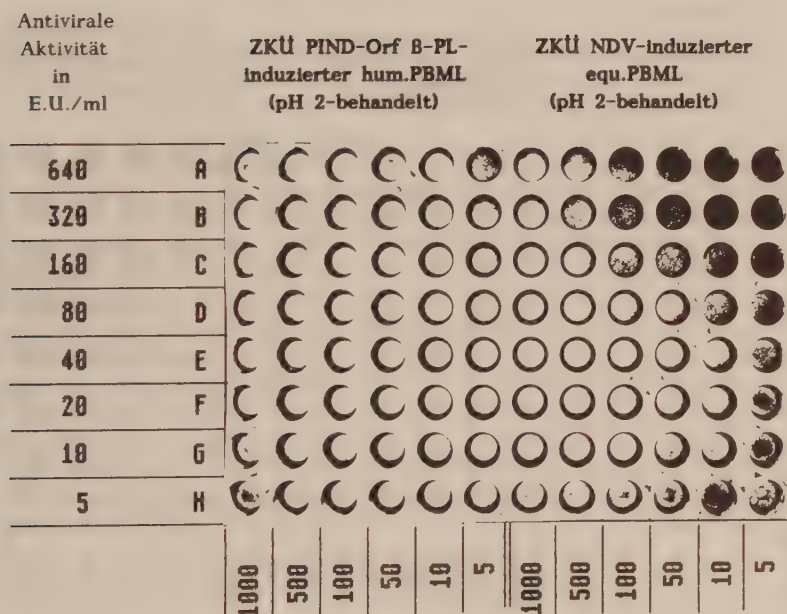
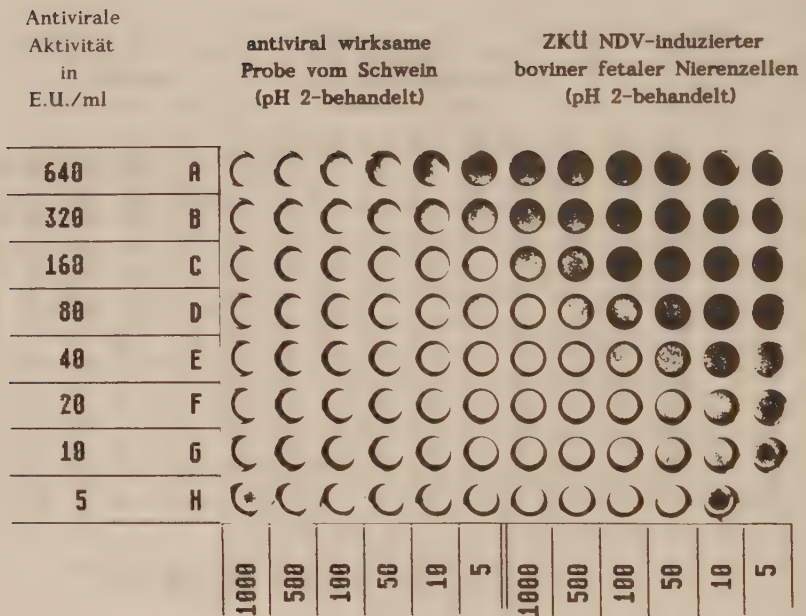


Abb. 17 b: "Schachbrett"-Neutralisation der antiviralen Wirksamkeit in Überständen humaner und equiner PBML-Kulturen mit Anti-HuIFN-Serum vom Schaf



n.U./ml Anti-HuIFN- α

Abb. 17 c: "Schachbrett"-Neutralisation der antiviralen Wirksamkeit im Überstand boviner BEK-Zellen und einer antiviral wirksamen Probe vom Schwein* mit Anti-HuIFN-Serum vom Schaf



n.U./ml Anti-HuIFN- α

* von Dr. Büttner zur Verfügung gestellt

Den neutralisierenden Effekt des Anti-HuIFN- α /HuIFN- β -Serums auf die VSV-antivirale Wirksamkeit (standardisiert in I.U./ml) der im Hauptversuch untersuchten Proben zeigt die Tabelle 22 :

Tabelle 22 : VSV-antivirale Aktivität untersuchter Proben nach Inkubation mit Antiserum vom Schaf gegen humanes Leukozyten-Interferon

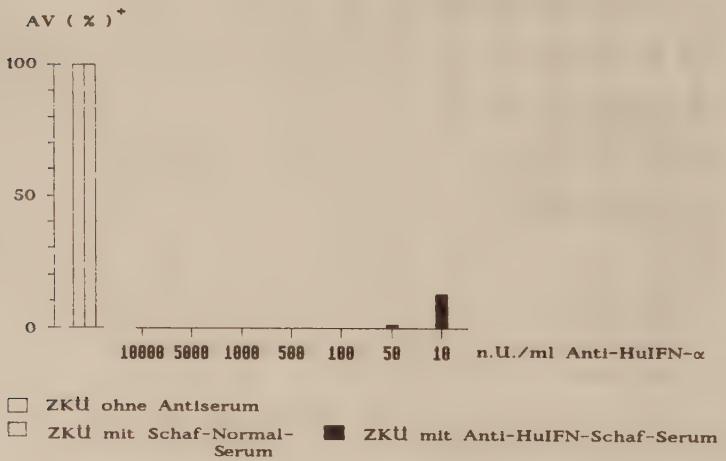
Probe/ Induzent	pH 2-stabile antivirale Aktivität in I.U./ml	antivirale Restaktivität (I.U./ml) nach Behandlung mit Anti-HuIFN-Serum								n.U./ml Anti-IFN- α	n.U./ml Anti-IFN- β
		10.000 66	5000 33	1000 7	500 3	100 1	50 0	10			
HuPBML-ZKt's:											
PIND-Orf B-PL	635	0	0	0	0	0	6	83			
equ.PBML-ZKt's:											
NDV	140	0	0	0	0	0	0	18			
EHV-1	48	0	0	3	6	6	6	12			
Parapox.	17	0	2	6	6	17	17	17			
PIND-Orf T	48	0	0	0	0	48	48	48			
BEK-ZKt's:											
NDV	146	0	4	13	19	55	73	110			
EHV-1	60	0	0	0	8	23	30	45			
PIND-Orf T	11	0	0	0	0	0	6	8			

Homologes System

Im homologen System wurde die antivirale Aktivität in ZKÜ's PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML zu 99 % bei einer Antiserum-Aktivität von 50 n.U./ml (Anti-HuIFN- α) gehemmt.

Ab 100 n.U./ml konnte keine antivirale Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Abb. 18: Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML



(⁺ 100 % = 635 I.U./ml)

Heterologes System

Während der pH 2-stabile Anteil antiviraler Aktivität in ZKÜ's der NDV-induzierten equ.PBML schon mit 50 n.U./ml (Anti-HuIFN- α) zu 100 % neutralisiert wurde, gelang dies bei ZKÜ's EHV-1- und Parapoxvirus ovis-induzierten equ.PBML erst mit 5000 bzw. 10.000 n.U./ml Anti-HuIFN- α (in diesen Verdünnungen enthält das Antiserum 33 bzw. 66 n.U./ml Anti-HuIFN- β -Aktivität). Die antivirale Aktivität in ZKÜ's PIND-Orf T-induzierter equ.PBML war mit 500 n.U./ml (Anti-HuIFN- α) aufzuheben.

Abb. 19 : Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
NDV-induzierter equiner PBML

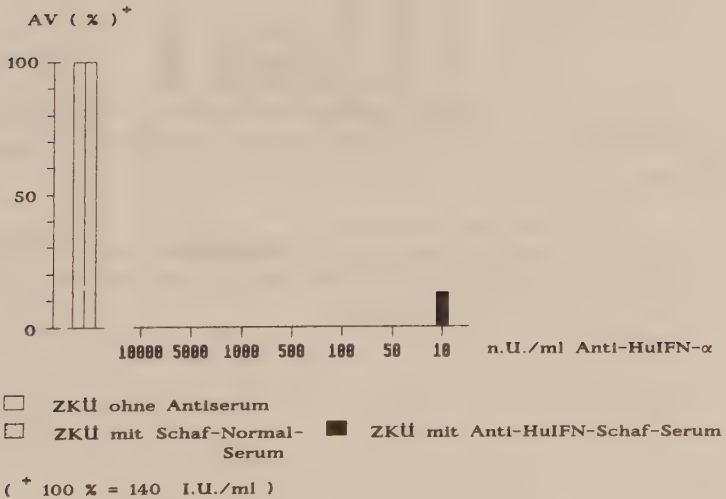


Abb. 20 : Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
EHV-1-induzierter equiner PBML

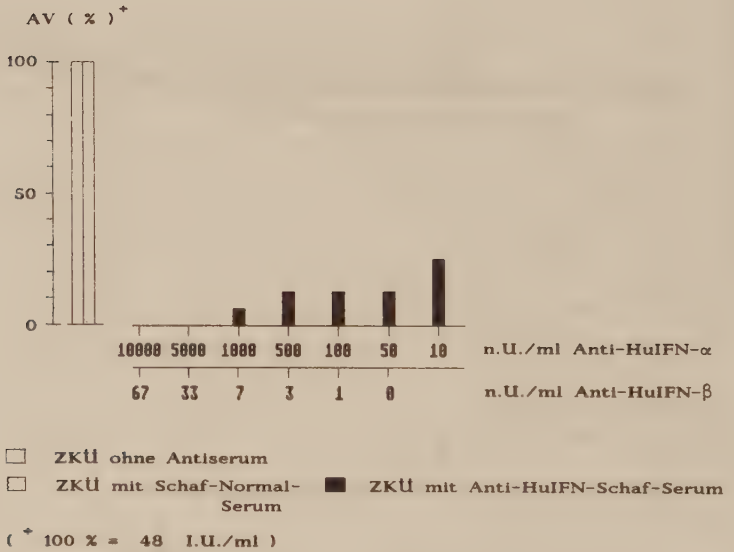


Abb. 21: Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
Parapoxvirus ovis-induzierter equiner PBML

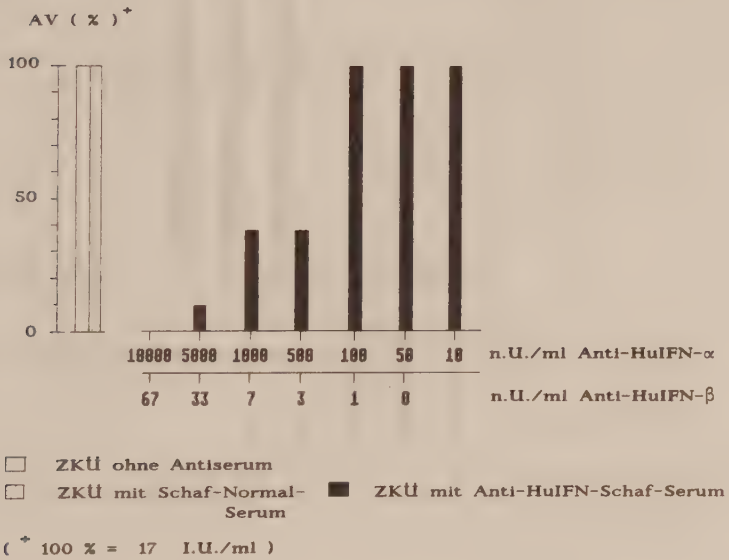
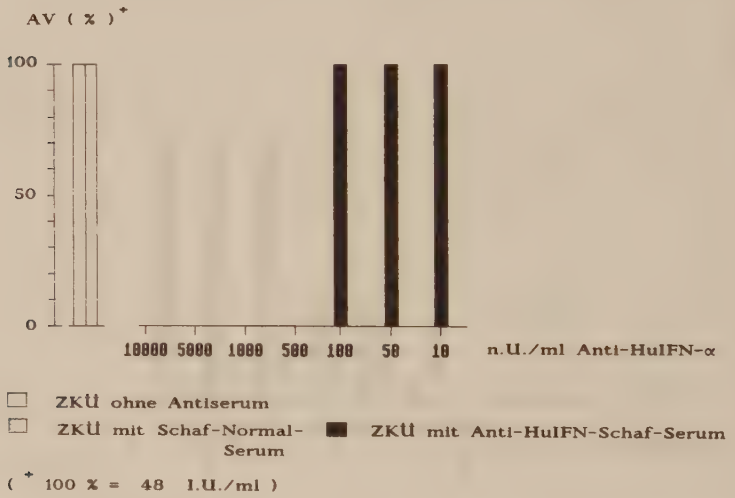


Abb. 22: Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKü
PIND-Orf T- induzierter equiner PBML



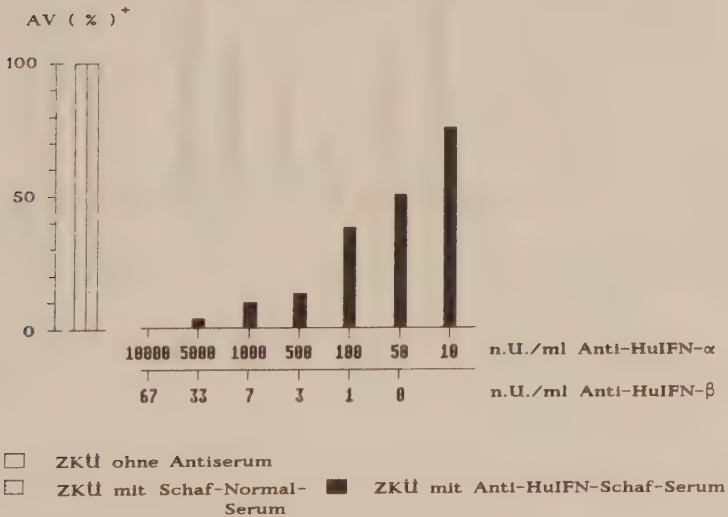
Der pH 2-stabile Anteil antiviraler Aktivität in ZKÜ's NDV-induzierter BEK-Zellkulturen wurde mit Anti-HuIFN-Serum der Aktivität 1000 n.U./ml gegen HuIFN- α zu 90 % neutralisiert.

Die vollständige Neutralisation der antiviralen Restaktivität im Überstand der NDV-induzierten BEK-Zellen (13 I.U./ml) erfolgte erst mit Antiserumkonzentrationen, in denen die Anti-HuIFN- α -Aktivität 10.000 n.U./ml und die Anti-HuIFN- β -Aktivität 67 n.U./ml betrug.

Antiserum der Aktivität 1000 n.U./ml hob die VSV-antivirale Wirksamkeit im ZKÜ EHV-1-induzierter BEK-Zellen vollständig auf.

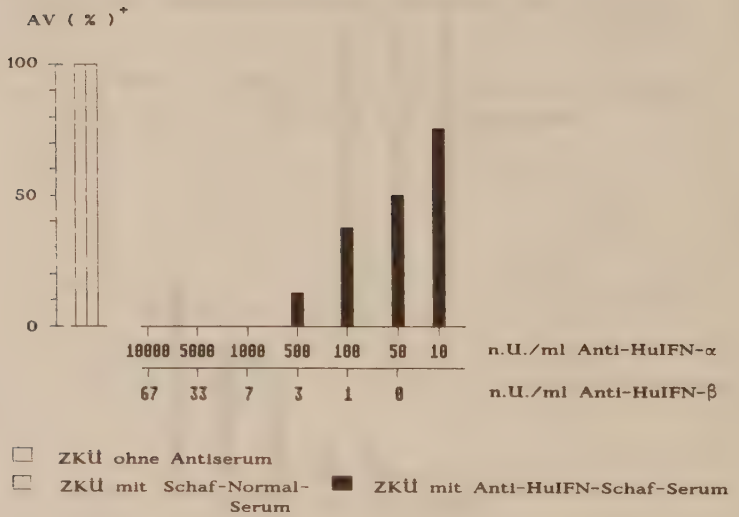
Bereits mit 100 n.U./ml Anti-HuIFN- α -Aktivität wurde die antivirale Wirkung des ZKÜ PIND-Orf T-induzierter, primärer BEK-Kulturen neutralisiert.

Abb. 23: Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
NDV-induzierter BEK-Kulturen



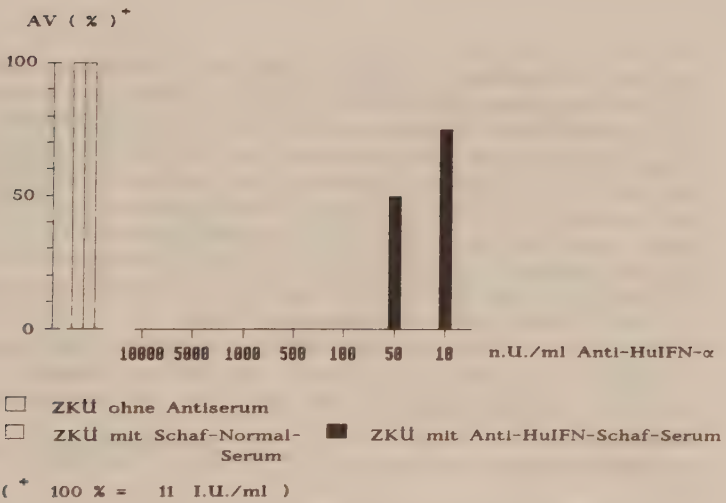
(⁺ 100 % = 146 I.U./ml)

Abb. 24: Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
EHV-1-induzierter BEK-Kulturen



(* 100 % = 60 I.U./ml)

Abb. 25: Neutralisation antiviraler Aktivität im ZKÜ
PIND-Orf T-induzierter BEK-Kulturen



3.2.4. Titerreduktion von equinem und bovinem Herpesvirus in homologen Zellkulturen nach Vorbehandlung mit antiviral wirksamen Zellkulturüberständen

3.2.4.1. Titerreduktion bei der EHV-1-Vermehrung in E.Derm.-Zellkulturen

Alle zur Vorbehandlung der E.Derm.-Zellkulturen verwendeten homologen und heterologen, VSV-antiviral wirksamen ZKÜ's bewirkten eine, von der Höhe der eingesetzten säurestabilen, antiviralen Aktivität abhängige Reduktion des EHV-1-Ertrages, verglichen mit dem Virusertrag auf unbehandelten E.Derm.-Zellkulturen. Die Zellkultur-Vorbehandlung mit Induzenten-Kontroll-ZKÜ's zeigte keinen Einfluß auf den Titer von EHV-1 in der zur Virusvermehrung vorgegebenen Zeit. Die EHV-1-Titerhöhe entsprach der in unbehandelten E.Derm.-Monolayern erreichten KID_{50}/ml ($8,39 \times 10^5$). Eine Interferenz der Induzentenvirusarten mit EHV-1 konnte somit nicht festgestellt werden.

Der Virus-Ertrag in Überständen nur EHV-1-beimpfter Zellkulturen zum Zeitpunkt der Endablesung (i.d.R. am 3. Tag p.infect.) betrug $8,39 \times 10^5 KID_{50}/ml$ und wurde als 100 %-Wert des EHV-1-Ertrages festgelegt.

Antivirale Aktivität war in keinem der Kontroll-Überstände nachweisbar.

In den Abb. 25 bis 27 werden quantitativ der Einfluß der zur Vorbehandlung eingesetzten antiviralen Aktivität, vom jeweiligen Induzenten ausgehende Unterschiede der erzeugten antiviralen Wirksamkeit und der Einfluß antiviraler Aktivität (homolog/heterolog) auf die Vermehrung von EHV-1 auf E.Derm.-Zellkulturen dargestellt.

Tabelle 23 gibt einen Überblick über die EHV-1-Titer (KID_{50}/ml) nach der Einwirkung verschiedener VSV-antiviral wirksamer ZKÜ's homologer und heterologer Produzentenzellen auf E.Derm.-Zellkulturen.

Tabelle 23 : EHV-1-Titer auf E.Derm.-Zellen nach Behandlung der Zellen mit ZKÜ's definierter VSV-antiviraler Aktivität

Zur Zellbehandlung eingesetzte ZKÜ's	EHV-1-Titer auf E.Derm. in KID_{50}/ml			
	0	0,1	1	10 I.U.
(induzierte Zellen/Induzent)	(antivirale Aktivität pro $3,5 \times 10^5$ Zellen)			
equ PBML/NDV	8.39×10^5	2.11×10^5	2.11×10^5	5.29×10^4
"Priming"/NDV	---	2.11×10^5	1.33×10^4	8.39×10^2
EHV-1	---	2.11×10^5	1.33×10^4	8.39×10^2
Parapoxvirus ovis	---	2.11×10^5	4.21×10^4	2.11×10^4
PIND-Orf T	---	5.29×10^4	5.29×10^4	1.06×10^3
BEK/NDV	8.39×10^5	2.11×10^5	2.11×10^5	4.21×10^4
EHV-1	---	8.39×10^5	2.11×10^5	2.11×10^4
PIND-Orf T	---	8.39×10^5	8.39×10^5	2.98×10^5
humPBML/PIND-Orf B-PL	8.39×10^5	2.11×10^5	1.33×10^4	1.06×10^3

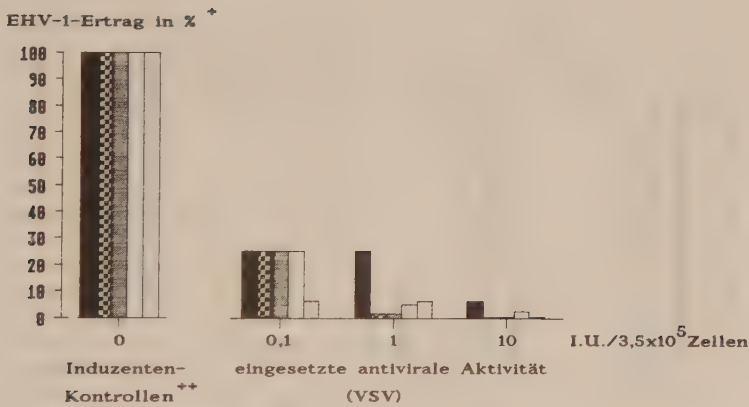
EHV-1-Ertrag auf E.Derm.-Zellkulturen nach Vorbehandlung mit homologen, antiviral wirksamen Zellkulturüberständen

Die ZKÜ's der NDV-induzierten equ.PBML-Kulturen (ohne "Priming") zeigten erst in der Konzentration von 10 I.U. VSV-antiviraler Aktivität eine Verringerung des EHV-1-Ertrages um über eine 10-er Potenz. Diese Reduktion war mit Überständen aus den "Priming"-Experimenten mit NDV, sowie ZKÜ's der EHV-1- bzw. Parapoxvirus-induzierten equ.PBML bereits bei 1 I.U. zu sehen. ZKÜ's PIND-Orf T-induzierter equ.PBML-Kulturen konnten schon mit 0,1 I.U. den EHV-1-Titer um eine log 10-Stufe vermindern. (siehe Abb. 26)

EHV-1-Ertrag auf E.Derm.-Zellkulturen nach Vorbehandlung mit heterologen, antiviral wirksamen ZKÜ's

Von diesen Zellkulturüberständen waren die der PIND-Orf B-PL-induzierten humanen PBML-Kulturen, mit einer Virusertragsverringerung um eine log 10-Stufe schon bei 1 I.U. antiviraler Aktivität, am wirksamsten. Die ZKÜ's NDV-induzierter BEK-Kulturen verursachten eine annähernd gleiche EHV-1-Titerreduktion, wie die der NDV-induzierten equ.PBML. Deutlich geringere Auswirkungen auf den EHV-1-Titerverlauf hatten die ZKÜ's EHV-1- und PIND-Orf T-induzierter BEK-Zellen, verglichen mit den ZKÜ's entsprechend induzierter equ.PBML. (siehe Abb. 27)

Abb. 26 : EHV-1-Titerreduktion in E.Derm.-Zellkulturen, die mit ZKÜ's unterschiedlich induzierter equ.PBML (homologes System) vorbehandelt wurden. Prozent der EHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten E.Derm.- Zellkulturen (= 100 %)



ZKÜ's induzierter equ.PBML :

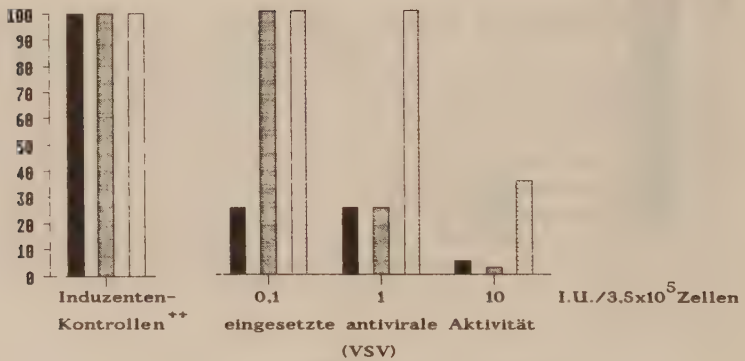
- NDV-induziert
- Parapoxvirus-induziert
- ▨ NDV-induziert (mit "Priming")
- ▤ PIND-Orf T-induziert
- ▦ EHV-1-induziert

(⁺ 100 % = $8,39 \times 10^5$ KID₅₀/ml

⁺⁺ Symbole der Virusinduzenten analog den ZKÜ's)

Abb. 27 : EHV-1-Titerreduktion in E.Derm.-Zellkulturen, die mit ZKÜ's unterschiedlich induzierter BEK-Zellkulturen (heterologes System) vorbehandelt wurden. Prozent der EHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten E.Derm.-Zellkulturen (= 100 %)

EHV-1-Ertrag in % ⁺



ZKÜ's induzierter BEK :

■ NDV-induziert □ PIND-Orf T-induziert
▨ EHV-1-induziert

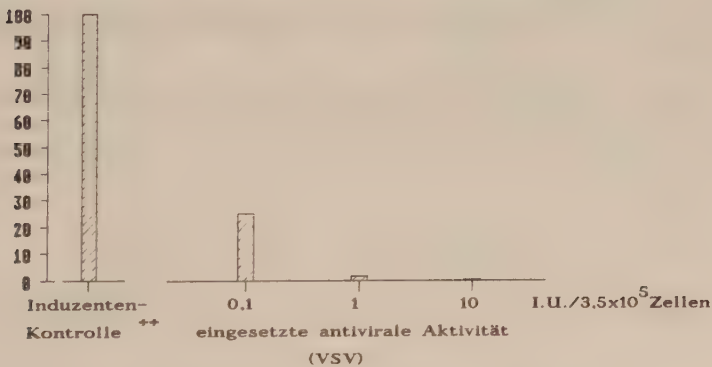
(⁺ 100 % = $8,39 \times 10^5$ KID₅₀/ml :

⁺⁺ Symbole der Virusinduzenten analog den ZKÜ's)

Die EHV-1-Titerreduktion durch den ZKÜ PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML war vergleichbar der Titerreduktion durch ZKÜ's NDV-(nach "Priming") und EHV-1-induzierter equiner PBML im homologen System.

Abb. 28 : EHV-1-Titerreduktion in E.Derm.-Zellkulturen, die mit ZKÜ's PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML vorbehandelt wurden. Prozent der EHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten E.Derm.-Zellkulturen (=100 %)

EHV-1-Ertrag in % ⁺



☒ ZKÜ PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML

(⁺ 100 % = $8,39 \times 10^5$ /ml

⁺⁺ Symbol des Virusinduzenten analog dem ZKÜ)

3.2.4.2. Titerreduktion bei der BHV-1-Vermehrung in MDBK-Zellkulturen

Mit Ausnahme der ZKÜ's NDV-induzierter BEK-Kulturen konnten alle zur Vorbehandlung der MDBK-Monolayer eingesetzten VSV-antiviral wirksamen Proben die BHV-1-Titer reduzieren. Zum Vergleich der Virusvermehrung wurde der BHV-1-Titer auf unbehandelten MDBK-Kulturen herangezogen.

Die MDBK-Zellbehandlung mit Induzenten-Kontroll-ZKÜ's ergab keinen Hinweis auf einen hemmenden Einfluß der Induzenten in den Konzentrationen, die in den eingesetzten ZKÜ's enthalten waren, auf die BHV-1-Titer. Der Virus-Ertrag in Überständen nur BHV-1-beimpfter Zellkulturen zum Zeitpunkt der Endablesung (i.d.R. am 3. Tag p.infect.) betrug 5.29×10^7 KID₅₀/ml und wurde als 100 %-Wert des BHV-1-Ertrages festgelegt.

In keinem der Kontroll-Überstände war eine antivirale Aktivität nachweisbar.

Die BHV-1-Erträge auf MDBK-Zellkulturen sind im Einzelnen in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24 : BHV-1-Titer auf MDBK-Zellkulturen nach Behandlung der Zellen mit ZKÜ's definierter VSV-antiviraler Aktivität

Zur Zellbehandlung eingesetzte ZKÜ's	BHV-1-Titer auf MDBK in KID ₅₀ /ml				
	0	0,1	1	10	I.U.
(induzierte Zellen/Induzent)	(antivirale Aktivität pro 3,5x10 ⁵ Zellen)				
BEK/NDV	5.29 x 10 ⁷	5.29 x 10 ⁷	5.29 x 10 ⁷	5.29 x 10 ⁷	5.29 x 10 ⁷
EHV-1	---	5.29 x 10 ⁷	8.39 x 10 ⁵	8.39 x 10 ⁵	8.39 x 10 ⁵
PIND-Orf	---	3.34 x 10 ⁶	3.34 x 10 ⁶	3.34 x 10 ⁶	3.34 x 10 ⁶
equ PBML /NDV	5.29 x 10 ⁷	5.29 x 10 ⁷	8.39 x 10 ⁵	5.29 x 10 ⁴	5.29 x 10 ⁴
"Priming"/NDV	---	5.29 x 10 ⁷	3.34 x 10 ⁶	3.34 x 10 ⁶	3.34 x 10 ⁶
EHV-1	---	5.29 x 10 ⁷	3.34 x 10 ⁶	8.39 x 10 ⁵	8.39 x 10 ⁵
Parapoxvirus	---	8.39 x 10 ⁵	2.11 x 10 ⁵	8.39 x 10 ⁵	8.39 x 10 ⁵
PIND-Orf	---	8.39 x 10 ⁵	2.11 x 10 ⁵	2.11 x 10 ⁵	2.11 x 10 ⁵
hu PBML /PIND-Orf B-PL	5.29 x 10 ⁷	1.33 x 10 ⁷	3.34 x 10 ⁶	8.39 x 10 ⁵	8.39 x 10 ⁵

BHV-1-Ertrag auf MDBK-Zellkulturen nach Vorbehandlung mit homologen, antiviral wirksamen Zellkulturüberständen

ZKÜ's NDV-induzierter BEK-Kulturen bewirkten mit keiner der zur MDBK-Vorbehandlung eingesetzten VSV-antiviralen Aktivitäten eine meßbare Reduktion des BHV-1-Titers.

Die Überstände EHV-1-induzierter BEK-Zellen konnten in einer Konzentration von 1 I.U. , die der PIND-Orf T-induzierten Kulturen bereits mit 0,1 I.U. den BHV-1-Ertrag um eine log 10-Stufe reduzieren. Durch Erhöhung der zur Zellkultur-Behandlung eingesetzten antiviralen Aktivität war in beiden Fällen keine weitere Verringerung des BHV-1-Ertrages zu erzielen. (siehe Abb. 29)

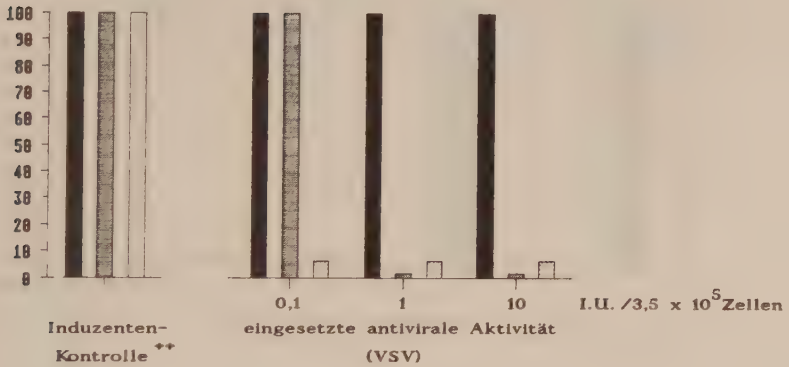
BHV-1-Ertrag auf MDBK-Zellkulturen nach Behandlung mit heterologen, antiviral wirksamen ZKÜ's

Alle auf equinen PBML mit den verschiedenen Induzenten hergestellten, antiviral wirksamen Zellkulturüberstände verursachten eine Reduktion der BHV-1-Titer in MDBK-Kulturen.

ZKÜ's NDV-induzierter (mit und ohne "Priming") equ.PBML, sowie EHV-1-induzierter equ.PBML reduzierten den BHV-1-Ertrag bei Einsatz von 1 I.U. VSV-antiviraler Aktivität deutlich um mehr als eine 10-er Potenz. Mit Überständen Parapoxvirus- und PIND-Orf T-induzierter equiner PBML- Kulturen wurde dies bereits mit 0,1 I.U. erreicht. (siehe Abb. 30)

Abb. 29 : BHV-1- Titerreduktion in MDBK-Zellkulturen, die mit ZKÜ's unterschiedlich induzierter BEK-Zellkulturen (homologes System)vorbehandelt wurden. Prozent der BHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten MDBK- Zellkulturen (= 100 %)

BHV-1-Gehalt in % ⁺



ZKÜ's induzierter BEK

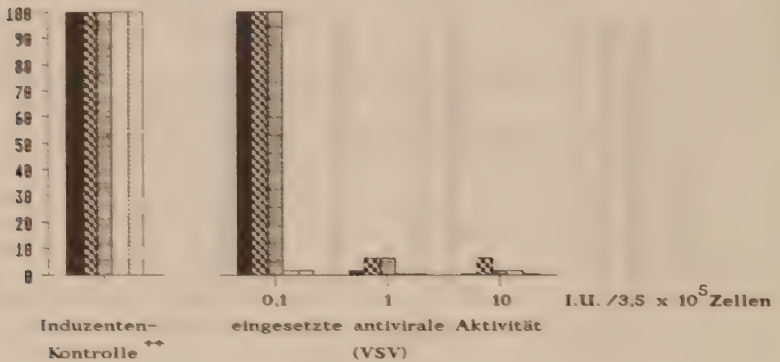
■ NDV- induziert □ PIND-Orf T-induziert
 ▨ EHV-1-induziert

(⁺ 100 % = $5,29 \times 10^7$ KID₅₀/ml

^{**} Symbole der Virusinduzenten analog den ZKÜ's)

Abb. 30 : BHV-1- Titerreduktion in MDBK -Zellkulturen, die mit ZKÜ's unterschiedlich induzierter equ.PBML-Zellkulturen (heterologes System)vorbehandelt wurden. Prozent der BHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten MDBK- Zellkulturen (= 100 %)

BHV-1-Gehalt in % *



ZKÜ's induzierter equ.PBML:

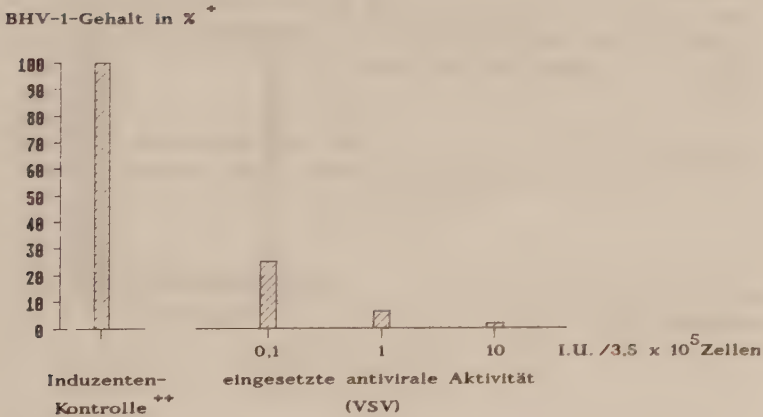
- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| ■ NDV-induziert | □ Parapoxvirus-induziert |
| ▨ NDV-induziert (mit "Priming") | □ PIND-Orf T-induziert |
| ▩ EHV-1-induziert | |

(* 100 % = $5,29 \times 10^7$ KID₅₀/ml

** Symbole der Virusinduzenten analog den ZKÜ's)

Die ZKÜ's PIND-Orf β -PL-induzierter humaner PBML zeigten eine ähnlich gute Hemmwirkung auf die BHV-1-Vermehrung auf MDBK-, wie schon auf die EHV-1-Vermehrung auf E.Derm.-Zellkulturen.

Abb. 31: BHV-1- Titerreduktion in MDBK -Zellkulturen, die mit ZKÜ's unterschiedlich induzierter humaner PBML-Zellkulturen (heterologes System)vorbehandelt wurden. Prozent der BHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten MDBK-Zellkulturen (= 100 %)



☐ ZKÜ PIND-Orf β -PL-induzierter hum.PBML

(⁺ 100 % = $5,29 \times 10^7$ KID₅₀/ml

⁺⁺ Symbol des Virusinduzenten analog dem ZKÜ)

3.2.4.3. Titerreduktion bei der BHV-1-Vermehrung in sekundären BEK-Zellkulturen

Jeder der zur Behandlung sekundärer BEK-Zellkulturen eingesetzte VSV-antiviral wirksame Zellkulturüberstand konnte die BHV-1-Vermehrung in diesem Zellsystem hemmen.

Bei der Überprüfung des Induzenten-Kontroll-ZKÜ's konnte keine Wirkung auf den BHV-1-Titer auf sek. BEK-Kulturen festgestellt werden. Der Virus-Ertrag in Überständen nur BHV-1-beimpfter Zellkulturen zum Zeitpunkt der Endablesung (i.d.R. am 3. Tag p.infect.) betrug $5,29 \times 10^7$ KID₅₀/ml und wurde als 100 %-Wert des BHV-1-Ertrages festgelegt.

Antivirale Aktivität war in keinem der Kontroll-Überstände meßbar. Tabelle 25 faßt die BHV-1-Erträge auf vorbehandelten und unbehandelten sekundären BEK-Zellkulturen zusammen:

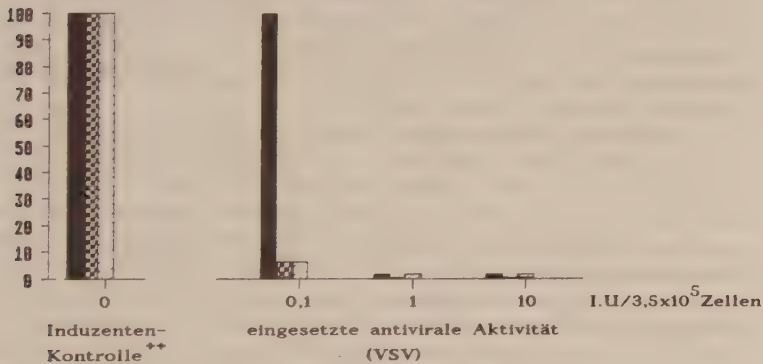
Tabelle 25 : BHV-1-Titer auf sek. BEK-Zellkulturen nach Behandlung der Zellen mit ZKÜ's definierter VSV-antiviraler Aktivität

Zur Zellbehandlung eingesetzte ZKÜ's	BHV-1-Ertrag auf sek.BEK KID ₅₀ /ml				
	0	0,1	1	10	I.U.
(induzierte Zellen/Induzent)	(antivirale Aktivität: pro $3,5 \times 10^5$ Zellen)				
BEK/NDV	$5,29 \times 10^7$	$5,29 \times 10^7$	$8,39 \times 10^5$	$8,39 \times 10^5$	$8,39 \times 10^5$
equ.PBML "Priming"/NDV	--	$3,34 \times 10^6$	$2,11 \times 10^5$	$2,11 \times 10^5$	$2,11 \times 10^5$
Hum.PBML /PIND-Orf β-PL	--	$3,34 \times 10^6$	$8,39 \times 10^5$	$8,39 \times 10^5$	$8,39 \times 10^5$

Sowohl der homologe Zellkulturüberstand NDV-induzierter, primärer BEK-Kulturen, als auch die heterologen ZKÜ's NDV-induzierter equ. PBML-Kulturen (mit "Priming") bzw. PIND-Orf β -PL-induzierter hum. PBML-Kulturen zeigten eine deutlich stärkere titerreduzierende Wirkung bei der BHV-1-Vermehrung in sek.BEK-Kulturen, als in MDBK-Kulturen.

Abb. 32 : BHV-1-Titerreduktion in sek.BEK-Zellkulturen, die mit VSV-antiviral wirksamen ZKÜ's unterschiedlicher Zellkulturen behandelt wurden. Prozent der BHV-1-Titerreduktion bezogen auf den Titer in unbehandelten sek.BEK-Zellkulturen (= 100 %)

BHV-1-Gehalt in % ⁺



- ZKÜ NDV-induzierter prim.BEK-Kulturen
- ▤ ZKÜ NDV-induzierter equ.PBML-Kulturen (mit "Priming")
- ZKÜ PIND-Orf β -PL-induzierter hum.PBML-Kulturen

(⁺ 100 % = 5.39×10^7 KID₅₀/ml

⁺⁺ Symbole der Virusinduzenten analog den ZKÜ's)

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Ein antiviraler Schutz kann durch eine Reihe von Zytokinen entweder direkt oder indirekt durch Induktion anderer Zytokine in der Zelle erzeugt werden. Zytokine sind im regulatorischen Netzwerk und der homöostatischen Kontrolle des Immunsystems so eingebunden, daß jede Zytokin-Bestimmung artifiziell und den jeweiligen experimentellen Bedingungen unterworfen ist (21). Bei der Festlegung definitiver Zytokineigenschaften muß deswegen dementsprechend vorsichtig operiert werden. Dies kommt zum Beispiel bei dem Begriff "Interferon" zum Ausdruck, der mittlerweile folgendermaßen umschrieben wird: "Eine Substanz sollte nicht Interferon genannt werden, wenn sie zusätzlich zu ihren zahlreichen anderen Eigenschaften nicht ein signifikant breites Spektrum antiviraler Wirksamkeit aufweist." (21). In diesem Sinne kann man den hier erzeugten und geprüften Zellkulturüberständen durchaus Interferon-Wirkung zusprechen.

Die wichtigsten Ausgangsvoraussetzungen bei der in vitro Produktion von natürlichen Interferonen sind die Produzentenzelle und der Induzent. Abgesehen von der Tatsache, daß unter physiologischen Bedingungen laufend Zytokinsynthesen, also auch Synthesen antiviral wirksamer Zytokine wie Interferon, stattfinden, ist die Rolle antiviral wirksamer Substanzen in Abwehrsituationen (z.B. nach Infektionen) von besonderer Bedeutung. Wie zur Zeit bekannt, kann jede kernhaltige Körperzelle IFN- α und/oder - β produzieren (21,22,48). Anders ist die Situation für IFN- γ , das durch antigenspezifische Induktion von T-Zellen entsteht. IFN- γ wirkt also aus dem Immunsystem, wogegen die Wirkungen von IFN- α und - β sowohl von Immunzellen, als auch von anderen Körperzellen ausgehen können (21).

Doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA = double stranded ribonucleic acid) wird als hochwirksamer Induzent von IFN- α und - β angesehen (22). Eine intakte Sekundärstruktur und ein hohes Molekulargewicht werden als unbedingte Induzenteneigenschaften genannt (22).

Eine starke Induktion extrazellulär nachweisbarer, antiviraler Aktivität konnte in beiden Zellsystemen mit vermehrungsfähigem NDV, besonders bei hoher MOI, gezeigt werden. Bei der über 3 Tage beobachteten Induktionskinetik waren immer bereits 24 Stunden post inductionem die höchsten VSV-antiviralen Titer erreicht. Die "Priming"-Experimente brachten die erwartete Steigerung der antiviralen Titer, besonders bei hoher MOI des NDV-Induzenten. Der Einsatz bereits nachgewiesener antiviraler Aktivität in Kombination mit dem NDV-Induzenten (MOI = 100) erwies sich am effektivsten.

Nachdem alle tierischen Viren unter geeigneten Bedingungen IFN induzieren (22), kann ein gemeinsamer Induktionsmechanismus angenommen werden, der über die Bildung von dsRNA ablaufen soll. (22,48,91) Für DNA-Viren als IFN-Induzenten ist die Bildung von dsRNA im Vermehrungszyklus bei Vaccinia- und Adenovirus gezeigt worden (19,92). DNA-Viren gelten in der Zellkultur, nicht jedoch immer in vivo, als schwächere IFN-Induzenten im Vergleich zu RNA-Viren (22,41). Bei einer ganzen Reihe von DNA-Viren ist die Bildung von dsRNA im Vermehrungszyklus nicht evident. In diesen Fällen sind die IFN-induzierenden Moleküle nicht bekannt. Die dsRNA als einziges IFN-induzierendes Molekül zu bezeichnen, ist ebenso gewagt und kaum mehr zu vertreten, da z.B. Polypeptide wie Wachstumsfaktoren ohne Anwesenheit eines viralen Induzenten Makrophagen zur IFN- β -Produktion aktivieren können (22).

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Viren konnten zum Teil starke antivirale Aktivitäten sowohl in peripheren Blutzellen des Pferdes, als auch in fetalen Nierenzellkulturen vom Rind induzieren. Dabei fällt auf, daß auch inaktiviertes Parapoxvirus (PIND-Orf β -PL) gut meßbare antivirale Aktivität in den Überständen der benutzten Produzentenzellen von Mensch, Pferd und Rind induzieren. Hier kann dsRNA als intermediärer Induzent mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Hühnerpockenvirus in inaktiver Form erwies sich, wie schon in früheren Untersuchungen bei der Maus (76), auch in vitro als schlechter IFN-Induzent. Im Gegensatz zu den nicht nachweisbaren antiviralen Effekten im Mäuseserum konnten jedoch nach in vitro Induktion von equ.PBML mit PIND-Avi VSV-antivirale Titer gemessen werden.

Erstaunlich hoch war die antivirale Aktivität, die durch Induktion primärer BEK-Zellen mit EHV-1 erzeugt wurde, während in diesem System NDV schwächer induzierend wirkte und Parapoxvirus gerade noch nachweisbare Titer induzierte. Dies mag an der Besonderheit der Produzentenzellen liegen. Beim Rind (wie auch bei Pferd und Schwein) wurden mindestens 5 Gene in der IFN- β -Genfamilie nachgewiesen, im Gegensatz zum Primaten (auch bei Kaninchen, Katze und Löwe), bei dem nur für 2 IFN- β -Gene sichere Erkenntnisse vorliegen (23,48). Nierenzellen vom Rind sollen bevorzugt IFN- β synthetisieren (54,56a,58). Parapoxvirus wäre demnach ein schlechter IFN- β -Induzent, wobei zu berücksichtigen ist, daß BEK-Zellen ein ideales Vermehrungssystem für Parapoxviren sind (55). Für EHV-1 und NDV gelten sie als nicht permissiv.

Die Diversität von IFN-Subtypen, die ja von IFN- α bekannt ist (mindestens 14 IFN- α -Unterarten beim Menschen) (48), könnte entscheidend die antivirale Qualität und Quantität der getesteten Zellkulturüberstände, abhängig von Induzenten und Produzentenzellen, bestimmen. Ein gutes Beispiel hierfür ist die antivirale Aktivität von humanem IFN- α_1 im Vergleich zu der von humanem IFN- α_2 . So wurde geschätzt, daß zur Induktion antiviraler Wirksamkeit in menschlichen Zellen ca. 100 mal mehr Moleküle HuIFN- α_1 pro Zelle nötig sind, als HuIFN- α_2 (113). Derartige in vitro analysierte Unterschiede lassen sich jedoch nicht unbedingt auf den Schutz vor Virusinfektionen in vivo übertragen, wie das Modell der EMCV-Infektion beim Affen (squirrel monkey) zeigt (109). Die IFN- α -Subtypen besitzen auch andere funktionelle Eigenarten, wie z.B. unterschiedlich starke antiproliferative Effekte oder verschiedene NK-Zell-stimulierende Potenz (29,95).

Was die Quantität induzierter antiviraler Aktivität betrifft, ist nach den neueren Erkenntnissen aus Untersuchungen an der Einzelzelle (131) kein schlüssiger Zusammenhang zwischen Zellmenge, Induzenten-MOI und der Höhe der IFN-Titer herzustellen. Mit der in situ-Hybridisierung wurde festgestellt, daß auch unter optimalen Bedingungen zur IFN-Produktion nur ein bestimmter Anteil potentiell IFN-produzierender Zellen tatsächlich IFN synthetisiert (131). Die Zahl der wirklichen Effektorzellen bei einem Induktionsvorgang läßt sich also ebenso wenig vorhersagen, wie die Art der IFN-Typen und -Subtypen, die produziert werden.

Die IFN-Klassen-Zusammensetzung in den antiviral wirksamen Proben kann jedoch mit monoklonalen Antikörpern analysiert werden. (60,79,104,105). Leider stehen für viele Haustierspezies noch keine monoklonalen Antikörper zur IFN-Typisierung zur Verfügung, so wie auch NIH (=National Institute of Health)-Referenz Interferone nur für die Spezies Mensch, Maus und Kaninchen erhältlich sind (80). Deshalb wurde hier mit einer NIH-HuIFN- α -Referenz zur Standardisierung der Titerangaben gearbeitet, und zur Abgrenzung der antiviralen Aktivität von IFN ein heterologes Anti-HuIFN-Serum vom Schaf eingesetzt.

In den Neutralisationsversuchen konnte speziesübergreifend eine Aufhebung der VSV-antiviralen Wirksamkeit auf MDBK-Zellen festgestellt werden. Dies ist sicher der IFN-Antikörpervielfalt in diesem polyklonalen Serum zuzuschreiben, zumal die Immunisierung des Tieres mit natürlichem humanen Leukozyten Interferon vorgenommen wurde (84). Die neutralisierende Kapazität war gegenüber bovinem IFN am schwächsten ausgeprägt. Nachdem gegen equines IFN eine relativ starke neutralisierende Potenz des Anti-IFN-Serums ersichtlich war, wurden einige stark antiviral wirksame Proben vom Pferd in einem ELISA-System mit monoklonalen Antikörpern gegen HuIFN- α und HuIFN- γ untersucht. (Daten nicht gezeigt)*. Equines IFN konnte von diesen Antikörpern nicht erkannt werden. Grund dafür könnte die hohe Epitopspezifität monoklonaler Antikörper sein, so daß schon geringe Unterschiede in Aminosäuresequenzen ausschlaggebend für die Nichterkennung sind, obwohl die Homologie der Proteinstrukturen von equinem und humanem IFN- α bis zu 77 % erreichen kann (39). Wegen der bekannten Titer des Anti-IFN-Serums gegen HuIFN- α und - β wurden zu Kreuz-Neutralisationstests nur Proben mit säurestabiler antiviraler Aktivität eingesetzt.

* Der ELISA-Test wurde von Dr Voth, Klinisch-Immunologisches Labor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz, durchgeführt.

Die abschließenden Versuche zur Virus-Ertragsreduktion von EHV-1 und BHV-1 wurden im Hinblick auf praktische Belange (IFN-Induktion in vivo, IFN-Therapie) durchgeführt. Die in vitro Ergebnisse lassen sich zwar nicht auf in vivo Verhältnisse übertragen, sollen aber generell die Reaktion der equinen und bovinen Zelllinien, sowie der fetalen bovinen Organkultur auf die Vermehrung praxisrelevanter Herpesvirusarten unter antiviralem Einfluß bzw. IFN-Einfluß aufzeigen. Besonders deutlich wird bei diesen Versuchen, daß offensichtlich die Qualität einer antiviral wirksamen Probe vorrangig vor ihrem absoluten Gehalt an antiviraler Aktivität ist. Spezieshomologe Proben hatten alle einen Titer-reduzierenden Effekt auf die EHV-1-Vermehrung in E.Derm-Zellen nach 3-tägiger Inkubation. Qualitativ konnten Proben aus PIND-Orf T-induzierten equi.PBML den stärksten Titerrückgang bewirken (mit nur 0,1 I.U. um eine log₁₀-Stufe). Zellkulturüberstände bovinen Ursprungs induzieren eine erkennbare EHV-1-Titer-Reduktion in geringerem Ausmaß abhängig vom Induzenten, für alle Induzenten aber erst bei 10 I.U. VSV-antiviraler Aktivität. Die Probe aus PIND-Orf B-PL-induzierten humanen PBML konnte den Ertrag vermehrungsfähiger equiner Herpesvirione in der E.Derm.-Kultur wiederum schon mit 0,1 I.U. um fast eine Zehnerpotenz reduzieren, mit 10 I.U. um mehr als zwei Zehnerpotenzen. Neben einem möglichen speziesrestriktiven Effekt scheinen humane und equine PBML qualitativ bessere Quellen antiviraler Wirksamkeit bei der Hemmung der EHV-1-Vermehrung auf E.Derm.-Kulturen zu sein, als fetale bovine Nierenzellen.

Qualitativ gleichwertige antivirale Aktivität gegenüber der BHV-1-Vermehrung auf MDBK-Zellen konnte sowohl in der homologen, als auch in der heterologen Zellspezies mit PIND-Orf T induziert werden. Die Probe NDV-induzierter boviner Zellen konnte auf den BHV-1-Titer in MDBK, im Gegensatz zur Wirkung in sek. BEK-Zellen, nicht reduzierend wirken. Ursache hierfür könnte die fehlende Spezifität bzw. die geringere Affinität der IFN-Rezeptoren auf MDBK-Zellen gegenüber den von NDV in primären BEK-Zellen induzierten IFN-Typen sein. Solche Affinitätsunterschiede sind z.B. auch für die deutlich höhere antivirale Aktivität humaner IFN's in MDBK-Zellen im Vergleich zu humanen Zelllinien verantwortlich gemacht worden (91). Die PIND-Orf B-PL-induzierte antivirale Aktivität aus humanen PBML erreicht BHV-1-Titerreduktionen gleichen Ausmaßes in sek. BEK-Kulturen mit 10-fach geringerer Dosierung als auf MDBK. Sekundäre BEK-Zellen scheinen gegen-

über den BHV-1-reduzierenden Eigenschaften der geprüften antiviral wirksamen Proben homologen und heterologen Ursprungs sensitiver als MDBK-Zellen zu sein.

Unter den geprüften Testzellen erwies sich die MDBK-Zelllinie hoch sensitiv für alle VSV-antiviral wirksamen Proben. Mit Ausnahme der Reaktion der E.Derm.-Zelllinie auf nicht behandelte Zellkulturüberstände induzierter BEK-Kulturen konnten regelmäßig mit MDBK-Zellen die höchsten antiviralen Titer gemessen werden. Daß dies nicht auf homologe Proben beschränkt ist, wurde bereits früher mit dieser Testzelllinie festgestellt (34a,83a). Neben den Interferonen wurde die Sensitivität heterologer Zellen gegenüber Zytokinen mit antiviraler Wirksamkeit nur für den Tumor Nekrose Faktor (TNF) hinreichend geprüft (45). TNF soll nur in homologen Zellsystemen nachweisbare antivirale Aktivitäten induzieren. Rekombinanter humaner TNF zeigte z.B. in bovinen Nierenzellen keine VSV-antivirale Wirksamkeit (45).

Aus den vorliegenden Versuchsprotokollen ist ersichtlich, daß Vertreter einer Virusfamilie (Poxviridae) ganz unterschiedliche Potenz bei der Induktion antiviraler Substanzen haben können, und daß ferner der jeweilige Zustand eines Virusinduzenten - Wildtyp, attenuierter Stamm, vermehrungsfähig, teilinaktiviert, inaktiviert (verschiedene Behandlungsmethoden)- eine Rolle für die Induktionskapazität spielen kann (48,66,70,71,78,90,97). Entscheidend diktiert wird die Synthese antiviral wirksamer Substanzen jedoch vom Zelltyp, ihrem Differenzierungsstadium und der Reaktionsfähigkeit einer Zellspezies auf diverse Induzenten. Bei den hier in vitro eingesetzten Zellarten zeigte sich NDV, wie schon in zahlreichen anderen Versuchen belegt, als zuverlässiger Induzent (17,18,31,32,65,66,67,71,89,97,115,119,128).

Hinweise für die Praxisrelevanz einer erzielbaren endogenen IFN-Synthese geben die Versuche zur BHV-1- und EHV-1-Titerreduktion. Daraus läßt sich ableiten, daß, neben zahlreichen anderen Einflüssen von Paramunitätsinducern auf das Immunsystem, eine vom Körper selbst kontrollierte IFN-Induktion bei der Prophylaxe (und evtl. bei der Therapie) wichtiger Virusinfektionen (und möglicherweise auch anderer Infektionskrankheiten) in der Tiermedizin von Nutzen sein kann.

5. Zusammenfassung

Der Nachweis VSV-antiviraler Aktivität wurde mit 3 verschiedenen Zelllinien (MDBK, E.Derm., WISH) in einem praktischen Färbetest geführt. Überstände mit antiviraler Wirksamkeit konnten durch Induktion von Zellkulturen equiner peripherer mononukleärer Leukozyten (equ.PBML) und primärer boviner fetaler Nierenzellen (BEK) mit Viren (einem RNA- und 3 DNA-Viren) oder viralen Paramunitätsinducern (PIND) hergestellt werden. Nur in Überständen induzierter Zellkulturen ließ sich eine VSV-antivirale Aktivität feststellen. Die Sensitivität der Testzelllinien gegenüber der VSV-antiviralen Aktivität sowohl homologer bzw. heterologer Proben nach natürlicher Zellinduktion, als auch rekombinanter humaner Interferon- α -Proben differierte erheblich. Die MDBK-Zelllinie reagierte auf alle untersuchten Proben am sensitivsten.

Die Reaktion der verwendeten Produzentenellen auf die verschiedenen Induzenten antiviraler Aktivität -Newcastle Disease Virus (NDV), Parapoxvirus ovis, Avipoxvirus gallinae, equines Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) - war sehr unterschiedlich, wobei sich NDV in equ.PBML-Kulturen und EHV-1 in primären BEK-Kulturen als stärkste, Avipoxvirus gallinae dagegen in beiden Zellkultursystemen als schwächster der getesteten Induzenten erwiesen.

In "Priming"- Experimenten mit equ.PBML wurden, im Vergleich zu den Induktionsversuchen ohne Vorbehandlung, höhere antivirale Aktivitäten erzielt. Die Vorbehandlung mit NDV oder NDV-induzierter antiviraler Aktivität und nachfolgende Induktion mit NDV (in hohem Infektionsverhältnis) führte zu den höchsten VSV-antiviralen Titern.

Schaf-Anti-Serum mit bekannter Aktivität gegen humanes Interferon- α und - β (HuIFN- α , - β) wurde zur Neutralisation säurestabiler antiviraler Aktivität homologer und heterologer Proben verwendet. Die VSV-antivirale Aktivität in Überständen humaner, equiner und boviner Zellkulturen konnte in unterschiedlichem Ausmaß durch Inkubation mit Anti-IFN-Serum neutralisiert werden. Säurestabile antivirale Aktivität equinen Ursprungs wurde in höherem Ausmaß neutralisiert, als diejenige boviner Herkunft.

Die Wirksamkeit definierter VSV-antiviraler Aktivität auf den Virustrag von equinem Herpesvirus Typ 1 (EHV-1) und bovinem Herpesvirus Typ 1 (BHV-1) auf jeweils homologen Zellsystemen wurde geprüft. Unterschiedliche Mengen säurestabiler antiviraler Aktivität (definiert in internationalen Einheiten; international Units = I.U.), abhängig vom zellulären Ursprung und dem verwendeten Induzenten, führten zu Titerreduktionen von EHV-1 und/oder BHV-1 in vitro.

Summary

INVESTIGATIONS ON THE INDUCTION OF ANTIVIRAL ACTIVITY IN EQUINE PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR LEUCOCYTES AND BOVINE EMBRYONIC KIDNEY CELLS

A convenient dye uptake test was used for the demonstration of antiviral activity with three different sensitive cell lines and Vesicular Stomatitis Virus (VSV) as challenge. Substantial differences in the sensitivity of the test cell lines for homologous as well as heterologous, naturally produced VSV-antiviral activity and recombinant human interferon α (rHuIFN- α) preparations occurred. The MDBK cell line proved to be most sensitive for all probes tested.

Antiviral activity was generated by treatment of either freshly prepared equine peripheral blood mononuclear leucozytes (equ.PBML) or primary bovine embryonic kidney (BEK) cells with one RNA- and three DNA-virus species or viral paramunity inducers (PIND). VSV-antiviral activity could be demonstrated in the extracellular fluids of induced cell cultures only. The generation of antiviral activity released by producer cells differed markedly among the viral inducers -Newcastle Disease Virus (NDV), Parapoxvirus ovis, Avipoxvirus gallinae, Equine Herpesvirus Type 1 (EHV-1) - NDV in equ.PBML-cultures or EHV-1 in BEK-cultures, respectively, being the strongest and Avipoxvirus gallinae the weakest inducer in both cell systems.

To obtain higher concentrations of antiviral activity in cell free supernatants, "Priming" experiments were done. When combinations of NDV or NDV-induced antiviral activity were used as the primer and a high multiplicity of infection (MOI) of NDV as the inducer higher VSV antiviral activity was achieved.

A sheep serum with known potency of anti human interferon α and β (HuIFN α, β) neutralizing antibody was used for cross species neutralization tests of VSV antiviral activity. Antiviral activity was abolished by incubation with the anti-IFN serum in different degrees. Cross species IFN neutralization was shown whereby acid stable antiviral activity of equine origin was neutralized to a higher extent than that of bovine origin.

VSV-antiviral activity was taken in defined concentrations to test its efficacy on virus yield reduction of Equine Herpes Virus 1 (EHV-1) and Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) in vitro. The amounts of antiviral units (I.U.), necessary to reduce the titers of EHV-1 and/or BHV-1 in vitro varied, and were dependent upon the cellular source and the inducer used in the generation of VSV-antiviral supernatants.

- 1 Adolf.G.R., 1986:
Biologischer Assay für EqIFN-beta-1
Mitteilung Ernst Boehringer-Institut für Arzneimittelforschung;
Abteilung Gentechnologie - Gruppe Zellbiologie
- 2 Ahl,R., 1982:
Production and regulation of synthesis of interferon-beta in
bovine kidney cell cultures
Dev.Biol.Stand., 50, S. 159-166
- 3 Ahl,R., M. Gottschalk, 1986:
Production and purification of bovine interferon beta
in Methods of Enzymology - Vol.119: Interferons Part C; S.Pest-
ka(ed.); Academic Press, Inc., Orlando, ... ; Kap.30, S. 211-220
- 3a Ahl,R., O.C. Straub, 1985:
Comparison of interferon production in cattle after intranasal
infection with Parainfluenza-3 live vaccine and avirulent IBR/
IPV-Herpesvirus
Zbl.Vet.Med. B, 32, S. 407-416
- 4 ATCC, 1988:
Catalogue of cell lines & hybridomas
American Type Culture Collection, 6th ed.,
- 5 Babiuk,L.A., M.J.P. Lawman, G.A. Gifford, 1987:
Use of recombinant bovine alpha-1 interferon in reducing respi-
ratory disease induced by Bovine Herpesvirus type 1
Antimicrob.Agents Chemother., 31(5), S. 752-757
- 6 Baier,W., M. Berchtold, 1981:
Physiologie der Gravidität
in Tierärztliche Geburtshilfe: W.Baier, F.Schaetz (eds.); 5.Auflage;
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart; Kap.III, S. 29-30
- 6a Belardelli,F., F. Vignaux, E. Proietti, I. Gresser, 1984:
Injection of mice with antibody to interferon renders peritoneal
macrophages permissive for vesicular stomatitis virus and en-
cephalomyocarditis virus
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81, S. 602-606
- 7 Bell,D.M., N.J. Roberts jr., C.B. Hall, 1983:
Different antiviral spectra of human macrophage interferon
activities
Nature, 305, S. 319-321
- 8 Bielefeldt Ohmann,H., L.A. Babiuk, 1988:
Influence of interferons alpha₁ -1 and gamma and of tumor nec-
rosis factor on persistent infection with Bovine Viral Diarrhoea
Virus in vitro
J.gen.Virol., 69, S. 1399-1403

- 9 Bielefeldt Ohmann,H., M.J.P. Lawman, L.A. Babiuk, 1987:
Bovine interferon: it's biology and application in veterinary medicine
Antiviral Res., 7, S. 187-210
- 10 Billiau, A., 1987:
Interferons and inflammation
J.Interferon Res., 7, S. 559-567
- 11 Billiau,A., 1987:
Redefining interferon: the interferon-like antiviral effects of certain cytokines (interleukin-1, interferon- β -2, interferon-gamma) may be indirect or side effects
Antiviral.Res., 8, S. 55-70
- 12 Bocci, V., 1988:
Roles of interferon produced in physiological conditions. A speculative review
Immunology, 64, S. 1-9
- 13 Bonnem,E.M., R.K. Oldham, 1987:
Gamma-interferon: physiology and speculation on its role in medicine
J.Biol.Response Mod., 6(3), S. 275-301
- 14 Borden,E.C., I.B. Rosenzweig, G.I. Byrne, 1987:
Interferons: from virus inhibitor to modulator of amino acid and lipid metabolism
J.Interferon Res., 7, S. 591-596
- 15 Boyum, A., 1968:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood
Scand.J.Clin.Lab.Invest., 21(Suppl.97), S. 77-89
- 16 Capobianchi, M.R., F. DeMarco, P. DiMarco, F. Dianzani, 1988:
Acid-labile human interferon alpha production by peripheral blood mononuclear cells stimulated by HIV-infected cells
Arch.Virol., 99, S. 9-19
- 17 Carter,W.A., F.H. Johnson,jr., 1981:
Induction and production of interferon with porcine, bovine, and equine leucocytes
in Methods in Enzymology:Vol.78 - Interferons Part A; S.Pestka (ed.); Academic Press, Inc., Orlando, ...; Kap. 7, S. 48-54
- 18 Carver, D.H., P.I. Marcus, 1967:
Enhanced interferon production from chick embryo cells aged in vitro
Virology, 32, S. 247-257
- 19 Colby,C., P.H. Duesberg, 1969:
Double-stranded RNA in Vaccinia Virus infected cells
Nature, 222, S. 940-944

- 20 DeMaeyer,E., J. DeMaeyer-Guignard, 1982:
Immuno-modulating properties of interferons
Phil.Trans.R.Soc.Lond., 299(B), S. 77-90
- 21 DeMaeyer,E., J. DeMaeyer-Guignard, 1988:
From an antiviral factor to a family of multifunctional cytokines
in Interferons and other regulatory cytokines; E.M.DeMaeyer
(ed.); John Wiley & sons, Inc.; Kap. 1, S. 1-4
- 22 DeMaeyer,E., J. DeMaeyer-Guignard, 1988:
Induction of IFN-alpha and IFN-beta
in Interferons and other regulatory cytokines; E.M.DeMaeyer
(ed.); John Wiley & sons, Inc.; Kap. 3, S. 39-58
- 23 DeMaeyer,E., J. DeMaeyer-Guignard, 1988:
The interferon gene family
in Interferons and other regulatory cytokines; E.M.DeMaeyer
(ed.); John Wiley & sons,Inc.; Kap. 2, S. 5-38
- 24 Dianzani,F., M.R. Capobianchi, A. Dolei, 1983:
The interferon system: present knowledge and prospectiveness
Seminar in the CEC programme of coordination of research on
animal pathology, Venice, 27./28.April 1983; Office for Official
Publications of the European Communities, Luxembourg; S. 3-14
- 25 Domke-Opitz,I., P. Pobersch, S. Mittnacht, H. Kirchner, 1987:
Role of interferon in persistent infection of macrophages with
Herpes Simplex Virus
Virology, 159, S. 306-311
- 26 Faltynek,C.R., J.J. Oppenheim, 1988:
Interferons in host defense
J.Natl.Cancer Inst., 80(3), S. 151-153
- 27 Familletti,P.C., S. Rubinstein, S. Pestka, 1981:
A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for inter-
feron
in Methods in Enzymology: Vol.78 - Interferons Part A; S.Pest-
ka(ed.); Academic Press,Inc. Orlando, ...; Kap. 56, S. 387-394
- 28 Fish,E.N., K. Banerjee, N. Stebbing, 1983:
Human leucocyte interferon subtypes have different antiprolife-
rative and antiviral activities on human cells
Biophys.Biochem.Res.Comm., 112, S. 537-545
- 29 Fisher,P.B., A.F. Miranda, L.A. Babiss, S. Pestka, I.B. Weinstein,
1983:
Opposing effects of interferon produced in bacteria and of tumor
promoters on myogenesis in human myoblast cultures
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 80, S. 2961-2965
- 30 Fujiki,T., A. Tanaka, 1988:
Antibacterial activity of recombinant murine beta interferon
Infect.Immun., 56(3), S. 548-551

- 31 Fujita, T., S. Kohno, 1981:
Studies on interferon priming: cellular response to viral and nonviral inducers and requirement of protein synthesis
Virology, 112, S. 62-69
- 32 Giese, M., H. Kirchner, 1988:
Blocking of interferon synthesis in murine macrophages by pretreatment with interferon
Immunol.Lett., 18, S. 109-114
- 33 Gordon, J., M.A. Minks, 1981:
The interferon renaissance: Molecular aspects of induction and action
Microbiol.Rev., 45(2), S. 244-266
- 34 Gresser, I., 1984:
Roles of interferon in resistance to viral infection in vivo
in Interferon - Vol.2: Interferon and the immune system; J.Vilcek, E.DeMaeyer (eds.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Kap. 13, S. 221-247
- 34a Gresser, I., M.-T. Bandu, D. Brouty-Boye, M. Tovey, 1974:
Pronounced antiviral activity of human interferon on bovine and porcine cells
Nature, 251, S. 543-545
- 35 Grossberg, S.E., P.M. Jameson, J.J. Sedmak, 1984:
Assay of interferons
in Handbook of Pharmacology - Vol.71: Interferons and their Applications; P.E.Came, W.A.Carter (eds.); Springer Verlag, Berlin,...; Kap. 2, S. 23-43
- 36 Hechler, H., 1981:
Experimentelle Untersuchungen zur Stimulierung an der Immunreaktion beteiligter Zellen des Pferdes durch Paramunitätsinducer, Lektin und equines Herpesvirus
Vet.Med.Diss., München
- 37 Hellmeier, A., 1987:
Doppelblindstudie zur Wirksamkeitsbestimmung eines Interferonpräparates bei der Behandlung durchfallkranker Kälber
Vet.Med.Diss., München
- 38 Hilfenhaus, J., G.D. Polastri, 1985:
Antiviral effects of interferons in animals
in Interferon - Vol.4: In vivo and clinical studies; N.B.Finter, R.K.Oldham (eds.); Elsevier Science Publishers B.V.; Kap. 1, S. 3-21
- 39 Himmler, A., R. Hauptmann, G.R. Adolf, P. Swetly, 1986:
Molecular cloning and expression in Escherichia coli of equine type I interferons
DNA, 5(5), S. 345-356

- 40 Ho, M., 1973:
Animal viruses and interferon formation
in *Frontiers of Biology* - Vol.2: Interferon and interferon inducers; N.B. Finter (ed.); North Holland Publishing Company, Amsterdam, ...; Kap. 3, S. 29-44
- 41 Ho, M., 1984:
Induction and inducers of interferon
in *Interferon* - Vol.1: General and applied aspects; A. Billiau (ed.); Elsevier, Amsterdam; Kap. IV, S. 79-124
- 42 Hooks, J.J., B. Detrick-Hooks, A.I. Levinson, 1982:
Interferons and immune reactivity
J. Am. Vet. Med. Ass., 181(10), S. 1111-1114
- 43 Horisberger, M.A., 1988:
The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells
Virology, 162, S. 181-186
- 44 Isaacs, A., J. Lindenmann, 1957:
Virus interference : the interferon
Proc. Roy. Soc. Lond., B 147, S. 258-267
- 45 Ito, M., J.A. O'Malley, 1987:
Antiviral effects of human tumor necrosis factor
Lymphokine Res., 6(4), S. 309-318
- 46 Jacobsen, K., G.A. Rockwood, M. Abolhassani, D.L. Evans, S.W. Chitwood, L. Charamella, 1988:
Bovine leucocyte interferon: characterization and large-scale production
J. Interferon Res., 8, S. 137-142
- 47 Johnston, M.D., N.B. Finter, P.A. Young, 1981:
Dye uptake method for assay of interferon activity
in *Methods in Enzymology* - Vol.78: Interferons Part A; S. Pestka (ed.); Academic Press, Inc., Orlando, ...; Kap. 57, S. 394-399
- 48 Joklik, W.K., 1986:
Interferons
in *Fundamental Virology*; B.N. Fields and D.M. Knipe (eds.), Raven Press, New York; Kap. 15, S. 281-307
- 49 Kawade, Y., Y. Watanabe, 1984:
Neutralizing interferon by antibody: appraisals of methods of determining and expressing the neutralization titer
J. Interferon Res., 4, S. 571-584
- 50 Kawade, Y., 1986:
Quantitation of neutralization of interferon by antibody
in *Methods in Enzymology* - Vol.119: Interferons Part C; S. Pestka (ed.); Academic Press, Inc., Orlando, ...; Kap. 74, S. 558-573

- 51 Kedar, E., A.R. Rezai, J.V. Giorgi, R.P. Gale, R.E. Champlin, R.T. Mitsuyasu, J.L. Fahey, 1988:
Immunomodulating effects in vitro of interleukin-2 and interferon- γ on human blood and bone marrow mononuclear cells
Nat.Immun. Cell Growth Regul., 7, S. 13-30
- 52 Kerr, I.M., 1987:
The 2-5A system: a personal view
J.Interferon Res., 7, S. 505-510
- 53 Kirchner, H., 1986:
The interferon system as an integral part of the defense system against infections
Antiviral Res., 6, S. 1-17
- 54 Kirchner, H., 1984:
Interferons, a group of multiple lymphokines
Springer Semin.Immunopathol., 7, S. 347-374
- 55 Kretzdorn, D., 1985:
Untersuchungen über das Vorkommen von Parapocken bei Rind und Schaf in Japan
Vet.Med.Diss., München
- 56 Krown, S.E., 1987:
Interferon in 1987: the half full glass
J.Cancer Res.Clin.Oncol., 113, S. 503-506
- 56a Kurane, I., F.A. Ennis, 1987:
Induction of interferon α from human lymphocytes by autologous, dengue virus-infected monocytes
J.Exp.Med., 166, S. 999-1010
- 57 Kushnaryov, W.M., H.S. MacDonald, G.P. Lemense, J. DeBruin, J.J. Sedmark, S.E. Grossberg, 1988:
Quantitative analysis of mouse interferon-beta receptor-mediated endocytosis and nuclear entry
Cytobios, 53, S. 185-197
- 58 La Bonnadiere, C., H. Laude, K. Berg, 1986:
Biological and antigenic relationships between virus-induced porcine and human interferons
Ann.Inst.Pasteur/Virol., 137(E), S. 171-180
- 59 Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, C. Jemma, M. Giovarelli, G. Cavallo, 1988:
Interferon- γ is not an antiviral, but a growth-promoting factor for T lymphocytes
Eur.J.Immunol., 18, S. 503-509

- 60 Laskay,T., U. Andersson, J. Andersson, R. Kiessling, M. DeLey, 1986:
An immunoflourescent method for identifying individual IFN- γ -producing lymphocytes
J.Immunol.Meth., 95, S. 1-7
- 61 Lawman,M.J.P., G. Gifford, M. Gyongyossi-Issa, R. Dragan, J. Heise, L.A. Babiuk, 1987:
Activity of polymorphonuclear(PMN) leucocytes during bovine herpes virus-1 induced respiratory disease: effect of recombinant bovine interferon- α_1 -1
Antiviral Res., 8, S. 225-238
- 62 Lebon,P., M.J. Commoys-Chevalier, B.Robert-Galliot, C.Chany, 1982:
Different mechanisms for alpha and beta interferon induction
Virology, 119, S. 504-507
- 63 Lengyel,P., 1987:
Double-stranded RNA and interferon action
J.Interferon Res., 7, S. 511-519:
- 64 Lengyel,P., 1982:
Biochemistry of interferons and their actions
Ann.Rev.Biochem., 51, S. 251-282
- 65 Letchworth,G.J. III, L.E. Carmichael, 1983:
Production of interferon by bovine peripheral blood monocytes infected with bovid herpesvirus 2
Vet.Microbiol., 8(1), S. 69-80
- 66 Levy-Koenig,R.E., R.R. Golgher, K. Paucker, 1970:
Immunology of interferons: II. Heterospecific activities of human interferons and their neutralization by antibody
J.Immunol., 104(4), S. 791-797
- 67 Ley,K.D., D. Burger, T. McGiure, J.B. Henson, 1970:
Equine interferon: absence in Equine Infectious Anaemia and kinetics of induction in equine cells
J.Infect.Dis., 122(1 & 2), S. 10-15
- 68 Lockart,R. Z., 1973:
Criteria for the acceptance of a viral inhibitor as an interferon and a general discription of the biological properties of known interferons
in: Frontiers of Biology - Vol.2: Interferon and interferon inducers; N. B.Finter (ed.); North Holland Publishing Company, Amsterdam, ...; Kap. 2, S. 11-27
- 69 Mahnel,H., 1984:
Systematik und Taxonomie der Säugerviren
nach den offiziellen Beschlüssen des ICTV (International Committee on Taxonomie of Viruses)

- 70 Marcus,P., M.J. Sekellick, 1987:
Interferon induction by viruses. XV.Biological characteristics of
interferon induction-suppressing particles of Vesicular Stomatitis
Virus
J.Interferon Res., 7, S. 269-284
- 71 Marcus,P.I., C. Svitlik, M.J. Sekellick, 1983:
Interferon induction by viruses.X. A Model for interferon induc-
tion by Newcastle Disease Virus
J.gen.Virol., 64(11), S. 2419-2431
- 72 Masig,E., 1988:
Untersuchungen über die Wirksamkeit von Immunstimulantien
aus Mikroorganismen und von Tierpockenpräparaten gegen Tu-
moren in vitro und in vivo
Vet.Med.Diss.,München
- 73 Mayr,A., 1982:
Paramunität und Paramunisierung
Zbl.Vet.Med.B., 29, S. 5-23
- 74 Mayr, A., H. Raettig, H. Stickl, M. Alexander, 1979:
Paramunität,Paramunisierung,Paramunitätsinducer - Teil I und II
Fortschr.Med., 97, S. 1159 und 1205
- 75 Mayr,A., J. Pette, K. Petzoldt, K. Wagener, 1968:
Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen
die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde
Zbl.Vet.Med.B., 15, S. 406
- 76 Mayr,A., M. Büttner, S. Pawlas, V. Erfle, B. Mayr, R. Brunner,
K. Osterkorn, 1986:
Vergleichende Untersuchungen ber die immunstimulierende (para-
munisierende) Wirksamkeit von BCG, Levamisol, Corynebacterium
parvum und Präparaten aus Pockenviren in verschiedenen "in
vivo" und "in vitro" - Testen
Zbl.Vet.Med.B, 33, S. 321
- 77 Mayr,A., P.A. Bachmann, B. Bibrack, G. Wittmann, 1974:
Virologische Arbeitsmethoden - Band I
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- 78 Mayr,A., 1966:
Gewinnung hochwertiger Interferone mit Hilfe von Pockenvirus-
Stämmen,die in Zellkulturpassagen abgeschwächt wurden
Zbl.f.Bakt.I.Orig., ,S. 183-190
- 79 Meager,A., 1987:
Antibodies against interferons: Characterization of interferons
and immunoassays
in Lymphokines and interferons - a practical approach; M.J.Cle-
mens, A.G. Morris, A.J.H.Gearing (eds.); IRL Press Limited, Ox-
ford; Kap. 8, S. 105-128

- 80 Meager, A., 1987:
Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization
in Lymphokines and interferons - a practical approach; M.J.Clemens, A.G. Morris, A.J.H.Gearing (eds.); IRL Press Limited, Oxford; Kap. 9, S. 129-148
- 81 Merigan, T.C., 1973:
Non-viral substances which induce interferon
in Frontiers of Biology - Vol.2: Interferons and interferon inducers; N.B. Finter (ed.); North Holland Publishing Company, Amsterdam, ...; Kap. 4, S. 45-72
- 82 Merigan, T.C., 1985:
Clinical effects of interferons
in: Cellular and Molecular Biology of Lymphokines; C.Sorg + A. Schimpl (eds.); Academic Press, New York; S. 699-709
- 83 Mestan, J., W. Digel, S. Mitnacht, H. Hillen, D. Blohm, A. Moeller, H. Jacobsen, H. Kirchner, 1986:
Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro
Nature, 323, S. 816-819
- 83a Mogensen, K.E., K. Cantell, 1977:
Production and preparation of human leucocyte interferon
Pharmacol. Ther., 1, S. 369-381
- 84 Mogensen, K.E., L. Phyhlae, K. Cantell, 1975:
Raising antibodies to human leucocyte interferon
Acta path. microbiol. Scand., 83(Sect.B), S. 443-450
- 85 Morris, A.G., 1988:
Interferons
Immunology, Suppl. 1988, S. 43-45
- 86 Murray, H.W., 1988:
Interferon-gamma, the activated macrophage, and the host defense against microbial challenge
Ann. Int. Med., 108(4), S. 595-608
- 87 NIH-Research reference reagent note No.31, 1984:
Freeze-dried reference human recombinant alpha 2 interferon, Catalog Number Gxa01-901-535
Research resources section, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, Maryland 20205
- 88 Nomenclature Committee, 1980:
Interferon nomenclature
Nature, 286, S. 110

- 89 Ogunkolade, W., M. Canivet, F. Pochart, A. Fourcade, S. Chousterman, A. Hovanessian, J. Peries, 1987:
Interferon inducibility and sensitivity of human terato-carcinoma-derived cell lines
J. Interferon Res., 7, S. 245-254
- 90 Oitkaeranta, A., K. Linnavouori, M. Roivainen, T. Hovi, 1988:
Induction of interferon- α in human leukocytes by polioviruses: wild-type strains are better inducers than attenuated strains
Virology, 165, S. 467-481
- 91 Pestka, S., J.A. Langer, K.C. Zoon, C.E. Samuel, 1987:
Interferons and their actions
Ann. Rev. Biochem., 56, S. 727-777
- 92 Petterson, U., L. Philipson, 1974:
Synthesis of complementary RNA sequences during productive adenovirus infection
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, S. 4887-4889
- 93 Pfeffer, L.M., E. Wang, I. Tamm, 1980:
Interferon inhibits the redistribution of cell surface components
J. Exp. Med., 152, S. 469-474
- 94 Preble, O.T., R.J. Black, R.M. Friedman, J.H. Klippel, J. Vilcek, 1982:
Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leucocyte interferon
Science, 216, S. 429-431
- 95 Rehberg, E., B. Kelder, E.G. Hoal, S. Pestka, 1982:
Specific molecular activities of recombinant and hybrid leucocyte interferons
J. Biol. Chem., 257, S. 11497-11502
- 96 Reis, L.F.L., J. Le, T. Hirano, T. Kishimoto, J. Vilcek, 1988:
Antiviral action of tumor necrosis factor in human fibroblasts is not mediated by B cell stimulatory factor 2/IFN- β_2 and is inhibited by specific antibodies to IFN- β
J. Immunol., 140(5), S. 1566-1570
- 97 Reyes Luna, V.E., A.D.H. Luk, S.K. Tying, J.M. Hellman, S.S. Lefkowitz, 1983:
Properties of bovine interferon
Experientia, 40, S. 1410-1412
- 98 Richter, R., 1983:
Untersuchungen zur Steigerung der Immunantwort durch den Paramunitätsinducer PIND-Orf bei Geflügel
Vet. Med. Diss., München
- 99 Rodriguez, J.E., T.R. Loepfe, N.S. Swack, 1987:
Beta interferon production in primed and unprimed cells infected with Human Cytomegalievirus
Arch. Virol., 94, S. 177-189

- 100 Rosenquist,B.D., R.W. Loan, 1967:
Interferon production with strain SR-4 of Parainfluenza-Virus
Am.J.Vet.Res., 28(124), S. 619-628
- 101 Rothermel,C.D., B.Y. Rubin, H.W. Murray, 1983:
 γ -interferon is the factor in lymphokine that activates human
macrophages to inhibit intracellular Chlamydia psittaci replicati-
on
J.Immunol., 131(5), S. 2542-2544
- 102 Rubinstein,M., 1987:
Multiple interferon subtypes: the phenomenon and its relevance
J.Interferon Res., 7, S. 545-551
- 103 Russell,S.W., J.L. Pace, 1987:
The effects of interferons on macrophages and their precursors
Vet.Immunol.Immunopath., 15, S. 129-165
- 104 Secher,D.S., D.C. Burke, 1980:
A monoclonal antibody for large-scale purification of human
leukocyte interferon
Nature, 285, S. 446-450
- 105 Skidmore,S.J., M.J. Jarlow, 1987:
Interferon assay as a viral diagnostic set
J.Virol.Meth., 16, S. 155-158
- 106 Skurkovich,S., B. Skurkovich, J.A. Bellanti, 1987:
A unifying model of the immunoregulatory role of the interferon
system: Can interferon produce disease in humans?
Clin.Immunol.Immunopath., 43, S. 362-373
- 107 Smith-Johannsen,H., Y.-T. Hou, X.-Y. Liu, Y.-H. Tan, 1984:
Regulatory control of interferon synthesis and action
in Handbook of Experimental Pharmacology - Vol.71: Interferons
and their applications; P.E.Came, W.A.Carter (eds.); Springer
Verlag, Berlin, ...: Kap. 6, S. 101-135
- 108 Splitter,G.A., L. Eskra, 1986:
Bovine T lymphocyte response to bovine herpesvirus-1: cell phe-
notypes, viral recognition and acid-labile interferon production
Vet.Immunol.Immunopathol., 11(3), S. 235-250
- 109 Stebbing, 1983:
Antiviral effects of bacteria-derived human leucocyte interferons
against Encephalomyocarditis Virus infection of squirrel monkeys
Arch.Virol., 76, S. 365-372
- 110 Steward,W.E. II, L.B. Gosser, R.Z. Lochart jr., 1971:
Priming: a non-antiviral function of interferon
J.Virol., 7(6), S. 792-801

- 111 Stickl, H., A. Mayr, 1979:
Über die Wirksamkeit eines neuen Paramunitätsinducers (PIND-Avi) für Mensch und Tier
Fortschr. Med., 97(40), S. 1781-1788
- 112 Stickl, H., T. Schleich, 1985:
Einsatz des Paramunitätsinducers bei reduzierter zellvermittelter Abwehrfähigkeit
Fortsch. Med., 103(39), S. 907-909
- 113 Streuli, M., S. Nagata, C. Weissmann, 1981:
At least three human type α interferons: Structure of $\alpha 2$
Science, 209, S. 1343
- 114 Suzuki, Y., M.A. Orellana, R.D. Schreiber, J.S. Remington, 1988:
Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*
Science, 240, S. 516-518
- 115 Tai, J.H., S.N. Han, 1987:
Studies on the production of porcine leucocyte interferon and porcine immune interferon: its cross-species antiviral activity
Han'guk Saenghwa Hakhoechi, 20(2), S. 137-142
- 116 Taylor, J.L., J.L. Sabran, S.E. Grossberg, 1984:
The cellular effects of interferon
in Handbook of Experimental Pharmacology - Vol. 71: Interferons and their application; P.E. Came, W.A. Carter (eds.); Springer-Verlag, Berlin, ..; Kap. 9, S. 169-195
- 117 Thein, P., W. Leistner, H. Hechler, 1980:
Erfahrungen mit dem Einsatz des Paramunitätsinducers PIND-Avi in der Pferdepraxis
Zbl. Vet. Med. B., 27, S. 499-512
- 118 Tovey, M.G., M. Streuli, I. Gresser, J. Gugenheim, B. Blanchard, J. Guymarho, F. Vignaux, M. Gigou, 1987:
Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, S. 5038-5042
- 119 Tsai, S.C., M.J. Apple, 1983:
Virus-induced interferon production in canine lymphoid cell cultures
Am. J. Vet. Res., 44(5), S. 1588-1592
- 120 Tsai, S.C., M.X. Appel, 1983:
Hyporesponsiveness to dog interferon in vitro
J. gen. Virol., 64, S. 2007-2012

- 121 Weigent,D.A., G.J. Stanton, M.P Langford, R.E. Lloyd, S. Baron, 1981:
Virus yield-reduction assay for interferon by titration of infectious virus
in Methods in Enzymology - Vol.78: Interferons Part A; S.Pestka (ed.); Academic Press, Inc., Orlando, ...; Kap. 50, S. 346-351
- 122 Wilkinson,M., A.G. Morris, 1985:
The interaction between interferons and macrophages
in: Mononuclear Phagocytes: physiology and pathology; R.T.Dean and W.Jessup (eds.); Elsevier, Amsterdam, ...; Kap. C.3, S. 161-179
- 123 Witter,F., F. Barouki, D. Griffin, P. Nadler, A. Woods, D. Wood, P. Lietman, 1987:
Biologic response (antiviral) to recombinant interferon alpha 2a as a function of dose and route of administration in healthy volunteers
Clin.Pharmacol.Ther., 42, S. 567-575
- 124 Wolf,G., 1986:
Kolonienstimulierende Aktivität in Mäuseseren nach Vorbehandlung mit Inducern aus Pockenviren und anderen Mikroorganismen
Vet.Med.Diss., München
- 125 Wong,G.H.W., D.V. Goeddel, 1986:
Tumor necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons
Nature, 323, S. 819-822
- 126 Woychiechowska,S., 1960:
Adaptacja krajowego wirusna zakasnego ronienia klaczy szczep RAC-heraldia do chomikow syryskich
Med.Dosw.Microb., 12, S. 255
- 127 Yamada,M., Y. Arao, A. Hatano, F. Uno, S. Nii, 1988:
Effect of recombinant mouse interferon- β on acute and latent herpes simplex infection in mice
Arch.Virol., 99, S. 101-109
- 128 Yilma,T., 1986:
Induction of equine interferons
in Methods in Enzymology - Vol.119: Interferons Part C; S.Pestka (ed.); Academic Press, Inc., Orlando, ...; Kap. 20, S. 130-136
- 129 Yilma,T., T.C. McGiure, L.P. Perryman, 1982:
Preliminary characterization of equine interferons and their antiviral activities on bovine, ovine and human cells
J.Interferon Res., 2(3), S. 363-370
- 130 Yoshida,R., H.W. Murray, C.F. Nathan, 1988:
Agonist and antagonist effects of interferon-alpha and -beta on activation of human macrophages
J.Exp.Med., 167, S. 1171-1185
- 131 Zawatzky, R., E. DeMaeyer, J. DeMaeyer-Guignard, 1985:
Identification of individual interferon-producing cells by in situ hybridization
Proc.Natl.Acad.Sci., 82, S. 1136-1140

7. Abkürzungen

AMP	Adenosin-monophosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
β-PL	beta-Propiolacton
BEK	bovine embryonic kidney
BEL	bovine embryonic lung
BHV-1	bovines Herpesvirus Typ 1
BoIFN	bovines Interferon
CHV	canines Herpesvirus
ConA	Concavalin A
cpE	zytopathogener Effekt
ds	double-stranded
EHV-1	equines Herpesvirus Typ 1
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
E.U.	experimental units (IFN)
	Endotoxin units (LPS)
cGMP	cyclisches Guanosin-monophosphat
HuIFN	humanes Interferon
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
I.U.	international units
KID ₅₀	mittlere Kultur-infektiöse Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
MKS	Maul-und-Klauenseuche-Virus
MOI	multiplicity of infection
NIH	National Institute of Health
NK	natural killer-cell
NDV	Newcastle Disease-Virus
n.U.	neutralizing units
2'-5' (A) _n -S	2'-5'-Oligoadenylylat-Synthetase

PBML	peripheral blood mononuclear leucocytes
PIND	Paramunitätsinducer
PBS	phosphat buffered saline
PHA	Phythaemagglutinin
Poly rI:rC	polyribonucleosinic acid-polyribocytidylic acid complex
prim.	primär
sek.	sekundär
ss	single-stranded
TNF	Tumor Nekrose Faktor
VSV	Stomatitis vesicularis-Virus
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Danksagungen

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr möchte ich an dieser Stelle herzlich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung danken.

Herrn Professor Dr. Kari Cantell, National Public Health Institute - Helsinki, danke ich für die prompte und kostenfreie Überlassung des Schaf-Anti-HuIFN-Serums.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Mathias Büttner für seine jederzeit gewährte, geduldige und kompetente Unterstützung und seine überaus wertvollen und konstruktiven Anregungen zur Durchführung und Gestaltung dieser Arbeit.

Bei Frl. Andrea Aigner möchte ich mich für die gündliche, sachkundige Einführung in die Laborarbeitstechniken, die freundliche, tatkräftige Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung technischer Probleme und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Georg Wolf für die jederzeit gewährten Ratschläge und Hilfen bei Problemen mit der elektronischen Datenverarbeitung.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die vielfältigen Handreichungen und Gefälligkeiten im Laboralltag.

Lebenslauf

- 1959 geboren am 13. Juli in Erding;
Eltern: Carl Lehner, Kaufmann
Hannelore Lehner, geb. Keller, Geflügelzüchterin
- 1965 kath. Knabenvolksschule Erding
- 1969 Gymnasium Erding (naturwissenschaftlicher Zweig)
- 1978 Abitur (reformierte Oberstufe)
- 1979 Wehrdienst
- 1980 Studium der Tiermedizin in München
- 1984 Verheiratung mit Michaela Pfanzelt
- 1986 Approbation als Tierarzt;
Promotionsstudium an der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München
- 1987 Beginn der vorliegenden Dissertationsarbeit;
Geburt meines Sohnes Lukas

